

Untersuchungen
über Superovulation, Embryogewinnung
und Embryokultivierung
sowie Tiefgefrierkonservierung
von Embryonen beim Schaf

Claudia Bouabid

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546219_0030

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

**Untersuchungen über Superovulation, Embryogewinnung und
Embryokultivierung sowie Tiefgefrierkonservierung
von Embryonen beim Schaf**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Claudia Bouabid
aus
Altötting

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Prof. Dr. G. Brem

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

meinem Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1.	Brunstsynchronisation	2
2.2.	Superovulation	3
2.3.	Belegung und Insemination	5
2.4.	Ergebnisse nach Superovulation	8
2.5.	Wachstum der Embryonen	11
2.6.	Gewinnung von Embryonen	12
2.7.	Spülmedien	16
2.8.	Kultur frischer Embryonen	16
2.9.	Transfer frischer Embryonen	18
2.9.1.	Synchronisation der Empfänger und Anzahl übertragener Embryonen	18
2.9.2.	Transfer von 4- bis 16-Zellern	18
2.9.3.	Transfer von Morulae und Blastozysten	20
2.10.	Tiefgefrierkonservierung	22
2.10.1.	Tiefgefriermedium und Gefrierschutzmittelzugabe	22
2.10.2.	Einfriervorgang und Seeding	25
2.10.3.	Auftauen und Ausverdünnung der Embryonen	28
2.10.4.	Kulturergebnisse nach Auftauen der Embryonen	31
2.10.5.	Transferergebnisse nach Auftauen der Embryonen	33
3.	TIERE UND METHODE	39
3.1.	Haltung und Fütterung	39
3.2.	Zyklussynchronisation und Superovulation der Spendertiere	39
3.3.	Vorbereitung der Empfängertiere	40

3.4.	Embryogewinnung	40
3.4.1.	Embryogewinnung nach Laparotomie	41
3.4.2	Embryogewinnung am exstirpierten Uterus	43
3.5.	Vorbereitung der Medien	46
3.5.1.	Reinigung und Sterilisation der benötigten Geräte	46
3.5.2	Vorbereitungsarbeiten	46
3.5.3.	Spül-, Aufbewahrungs- und Tiefgefriermedien	47
3.5.4.	Kulturmedien	49
3.6.	Morphologische Bewertung der Embryonen	51
3.7.	Kultivierung der Embryonen	52
3.8.	Tiefgefrieren der Embryonen	53
3.8.1.	Gefrierschutzmittelzugabe und Beschicken der Paillette	53
3.8.2.	Geräteeinordnung	54
3.8.3.	Tiefgefrierprotokoll	57
3.9.	Auftauen der Embryonen	57
3.10.	Kultur der aufgetauten Embryonen	58
3.11.	Transfer der aufgetauten Embryonen	58
4.	ERGEBNISSE	60
4.1.	Superovulation und Ovarreaktion	60
4.2.	Embryogewinnungsrate	62
4.3.	Embryogewinnung nach erster und zweiter Superovulation	62
4.4	Ovarreaktion und Befruchtungsrate	64
4.5.	Morphologie	65
4.6.	Kultivierung der Embryonen	66
4.6.1.	Morulae "Tag 5"	66
4.6.2.	Kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten "Tag 6"	67
4.7.	Tiefgefrieren der Embryonen	68
4.7.1.	Morulae "Tag 5"	68
4.7.2.	Kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten "Tag 6"	69

5.	DISKUSSION	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	82
7.	SUMMARY	
	"Studies on superovulation, embryo recovery, in vitro-culture and deep freezing of sheep embryos"	84
8.	LITERATURVERZEICHNIS	86

1. EINLEITUNG

Das Schaf diene, wohl nicht zuletzt wegen seiner Genügsamkeit bei Haltung und Fütterung und seiner Verwandtschaft zum Rind, oftmals als Modelltier für Untersuchungen über Superovulation, Embryotransfer sowie Kultivierung und Tiefgefrierkonservierung von Embryonen. Jedoch konnte sich bisher keine dieser Biotechniken als praxisreifes Verfahren in der Schafzucht durchsetzen.

Als hinderlich erweist sich vor allem, daß die Embryogewinnung beim Schaf chirurgisch erfolgen muß und somit die mehrmalige Spülung eines geeigneten Spenders, wie zum Beispiel beim Rind, wenn überhaupt, nur mit zum Teil erheblichen Einbußen bei der Anzahl der gewonnenen tauglichen Embryonen möglich ist.

Die Bedeutung der Tiefgefrierkonservierung dürfte beim Schaf im Anlegen von Embryobanken liegen, um die Bewahrung seltener Rassen auf lange Sicht zu gewährleisten, sowie im Schutz heute gebräuchlicher Rassen beim Ausbruch von Seuchen.

Für die Tierzucht ermöglicht das Tiefgefrieren von Embryonen den Erhalt genetischer Kontrolllinien zur Messung des Zuchtfortschritts ohne Haltung teurer Zuchtherden und die Sicherstellung eines breiten genetischen Materials. Erwähnt werden soll auch die Erleichterung von Im- und Export.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Reproduzierbarkeit eines Superovulationsschemas und der damit zu erwartenden Anzahl morphologisch intakter Embryonen überprüft werden. Zusätzlich wurde ein einfaches Verfahren für die Tiefgefrierkonservierung auf seine Anwendbarkeit untersucht. So wurden an Tag 5 und 6 nach der Bedeckung gewonnene Embryonen in unterschiedlichen Medien kultiviert oder mit Trockeneis und Alkoholbad "per Hand" eingefroren bzw. das hierfür erstellte Tiefgefrierprotokoll später auf ein automatisches Einfriergerät übertragen. Das Überleben der Embryonen nach dem Auftauen wurde sowohl durch Kultivierung in vitro als auch durch Transfer auf Empfängertiere überprüft.



2. LITERATUR

2.1. Brunstsynchronisation

In der Regel umfaßt der Zyklus des Schafes 17 ± 2 Tage. Auf den Östrus entfallen 30-36 Stunden, auf den Metöstrus 3 Tage, den Diöstrus 11 und den Proöstrus 2 Tage. Die Ovulation bzw. Ovulationen finden 11 Stunden vor bis 7 Stunden nach Ende des Östrus statt (DEDIE und BOSTEDT 1985; HULET und SHELTON 1980). Eine wichtige Voraussetzung für Superovulation und Embryogewinnung sowie für den Transfer von Embryonen sind die Möglichkeiten der Brunstsynchronisation bzw. die Steuerung von Östrus und Ovulationszeitpunkt.

Eine Brunstsynchronisation kann mit Vaginalschwämmen erfolgen, die 20 mg (BUNCH et al. 1984), 30 mg (GATICA et al. 1984; MC KELVEY et al. 1985) oder 40 mg (COGNIE und TORRES 1984; TORRES und COGNIE 1984) Fluorogestonacetat (FGA) bzw. 60 mg Medroxyprogesteronacetat (MAP; BONDIOLI und WRIGHT 1983; SCHIEWE et al. 1984; WALKER et al. 1985) enthalten. Die FGA-Schwämme verbleiben 12 (COGNIE et al. 1985; MC KELVEY et al. 1986) bis 14 Tage (ARMSTRONG und EVANS 1983; COGNIE und TORRES 1984), die MAP-Schwämme 8 bis 11 (COGNIE et al. 1985) bzw. 12 Tage (BONDIOLI et al. 1983; SCHIEWE et al. 1984; WRIGHT et al. 1981) intravaginal. Weitere Möglichkeiten der Synchronisation bieten entweder die Anwendung eines Progesteronimplantates (275 mg; BUNCH et al. 1984; WILLADSEN 1977) oder die tägliche Verabreichung von Progesteron für 12 bis 22 oder 12 bis 30 Tage (12 mg i.m.; TROUNSON und MOORE 1974;

ZANWAR und DESHPANDE 1984; 5 mg s.c.; WRIGHT et al. 1976).

Um die Sicherheit der Brunstauslösung zu erhöhen, werden bei Entnahme des Schwammes 300 (ARMSTRONG und EVANS 1983), 400 (COGNIE und TORRES 1984; WALKER et al. 1985) oder 500 I.E. (GATICA et al. 1984; TORRES und COGNIE 1984; WILLADSEN et al. 1976) PMSG gegeben. Die Brunst tritt 24-48 Stunden nach Entfernen des Schwammes ein (ARMSTRONG UND EVANS 1983; MUTIGA et al. 1983; TORRES und COGNIE 1984).

2.2. Superovulation

Um eine Superovulation auszulösen, können, 28 Stunden vor (MC KELVEY et al. 1986) oder bei Schwammentnahme bzw. am letzten Tag der Progesteroninjektion, 1000 bis 2000 I.E. **PMSG** verabreicht werden (ARMSTRONG und EVANS 1983; WILLADSEN et al. 1976; WILLADSEN 1977; WRIGHT et al. 1976; ZANWAR und DESHPANDE 1984; Tab. 1).

Bei Verwendung von **FSH** wird, 48 bzw. 36 (ARMSTRONG und EVANS 1983; BETTERBED und WRIGHT 1985) bis 24 Stunden (BONDIOLI und WRIGHT 1983; COGNIE et al. 1985; WRIGHT et al. 1981) vor Schwammentnahme beginnend, für 2 bis 3 Tage in 12-stündigem Intervall, eine Gesamtmenge von 16 bis 24 mg dieses Hormons (bzw. 12 bis 30 mg; SMITH 1984) in konstanter (COGNIE et al. 1985; TORRES und COGNIE 1984) oder abnehmender Dosis gegeben (BETTERBED und WRIGHT 1985; BONDIOLI und WRIGHT 1983; COGNIE und TORRES 1984; COGNIE et al. 1985; SCHIEWE et al. 1984; SMITH 1984; TORRES und COGNIE 1984; WRIGHT et al. 1981). Zur Unterstützung der Follikelreifung können innerhalb von 8 Stunden nach Östrusbeginn 25 mg LH in-

Tab. 1: Möglichkeiten der Hormonbehandlung für eine Superovulation

PMSG:

ARMSTRONG und EVANS (1983)	1500-2000 I.E.
MC KELVEY et al. (1986)	1000-1500 I.E. i.m.
WALKER et al. (1985)	1250 I.E.
WILLADSEN (1977)	1000-1250 I.E. i.m.
WRIGHT et al. (1976)	1100-2000 I.E.
ZANWAR und DESHPANDE (1984)	1000-1500 I.E. s.c.

FSH:

BETTERBED und WRIGHT (1985)	3 Tage, 12 Stunden-Intervall je 2x 5/4/3 mg
BONDIOLI und WRIGHT (1983)	3 Tage, 12 Stunden-Intervall je 2x 5/4/3 mg
COGNIE und TORRES (1984)	3 Tage je 2x 4/3/1 mg oder 2 Tage 6/5/3/2 mg
COGNIE et al. (1985)	2 Tage, 12 Stunden-Intervall 4x 4 mg oder 6/5/3/2 mg
SCHIEWE et al. (1984)	3,5 Tage, 2x pro Tag insgesamt 19 mg i.m.
SMITH (1984)	3,5 Tage, 2x pro Tag, insgesamt 12-30 mg, am 3. Tag 20 mg PGF _{2α}
TORRES und COGNIE (1984)	2 Tage, 12 Stunden-Intervall 4x 3 mg oder 5/4/2/1 mg
WRIGHT et al. (1981)	3 Tage, 12 Stunden-Intervall je 2x 5/4/3 mg und bei 50 % der Tiere innerhalb von 8 Stunden nach Östrusbeginn 25 mg LH

HAP:

GATICA et al. (1984)	3 Tage je 30 mg s.c.
TROUNSON und MOORE (1974)	3 Tage je gleiche Dosen insgesamt 48-68 mg s.c.

jiziert werden (WRIGHT et al. 1981). Wird mit der Verabreichung von FSH an Tag 7-10 des Zyklus begonnen, erfolgt zur Induktion des Östrus bei der vorletzten FSH-Gabe die Injektion von 20 mg $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SMITH 1984; Tab. 1).

HAP (Horse-Anterior-Pituitary-Extract), ein HVL-Extrakt des Pferdes, wird ab Tag 10 nach Einsetzen des Vaginalschwammes 3 Tage lang jeweils in einer Dosierung von 30 mg s.c. (GATICA et al. 1984) oder ab dem letzten Tag der Progesteroninjektion in drei gleichen Dosen in einer Gesamtmenge von 48-68 mg verabreicht (TROUNSON und MOORE 1974; Tab. 1).

2.3. Belegung und Insemination

Das Konzeptionsoptimum liegt 12 bzw. 16 bis 24 Stunden nach Östrusbeginn d.h. 8 bis 24 Stunden vor Ende des Östrus (BRAUN 1985; SCHINDLER und AMIR 1973).

Nach Beginn des Östrus können die Tiere entweder im freien Sprung (SCHIEWE et al. 1984) oder im Sprung an der Hand (COGNIE und TORRES 1984; GATICA et al. 1984; WRIGHT et al. 1981) bis zum Ende des Östrus mehrmals gedeckt werden.

Die künstliche Besamung kann mit Frischsperma (z.B. 0,2 ml $\approx$ $600-700 \times 10^6$ Spermien) erfolgen, das 50 oder 48 und 56 Stunden nach Schwammentnahme direkt kaudal der Zervix oder ca. 1 cm intrazervikal deponiert wird (ARMSTRONG und EVANS 1984; EVANS und ARMSTRONG 1984; MC KELVEY und ROBINSON 1986; MC KELVEY et al. 1986; MUTIGA et al. 1983; WRIGHT et al. 1976). Für die Durchführung der Insemination wird das Schaf stehend mit dem Hinterkörper

nach oben fixiert, ein Spekulum eingeführt und schließlich mit einer speziellen Besamungspipette für kleine Wiederkäuer besamt. Die dafür benötigte Beleuchtung erfolgt mittels einer Kopflampe (ARMSTRONG und EVANS 1984).

Bei Spermaübertragung nach Laparotomie werden, z.B. mit fein ausgezogenen Glaspipetten ca. 200 Millionen Spermien (TORRES und COGNIE 1984) bzw. 0,02 (WILLADSEN 1977) bis 0,2 ml (MC KELVEY et al. 1985; SCHIEWE et al. 1984) frisches Sperma in jedem Uterushorn oder im Corpus uteri abgesetzt. Die Besamung kann dabei z.B. 24-30 Stunden nach der letzten HAP-Injektion (TROUNSON und MOORE 1974) oder 48 Stunden nach der letzten Progesteronverabreichung (ZANWAR und DESHPANDE 1984) erfolgen.

MC KELVEY et al. (1985) verdünnten 1 Teil Sperma mit 3 oder 9 Teilen PBS und übertrugen mittels Laparoskopie 0,04 bzw. 0,1 ml pro Horn ($\approx 48 \times 10^6$ Spermien). Bei Frischsperma deponierten sie 0,25 ml ($\approx 600 \times 10^6$ Spermien) oder zweimal 0,2 ml ($\approx 960 \times 10^6$ Spermien) in jedem Uterushorn, gefolgt von 0,1 ml Luft. Die Insemination erfolgte bei Frischsperma 48 und 60 Stunden nach Entfernen des Schwammes, bei verdünntem Sperma 50 bis 56 Stunden nach Schwammentnahme. Ihre hierfür angewandte Technik entsprach weitgehend der 1984 für den Transfer von Embryonen benutzten (siehe 2.9., MC KELVEY und ROBINSON).

KILLEEN und CAFFERY (1982) übertrugen 48 Stunden nach Schwammentnahme mittels Laparoskopie 0,05 ml im Verhältnis 1:3 verdünntes Sperma pro Uterushorn. Nach Lokalanästhesie wurde das Schaf in einem Winkel von 30-40° mit dem Kopf nach unten abgelegt. 3-4 cm rechts und links der Linea alba wurden wenig kranial des Euters zwei Schnitte angelegt und Endoskop (links) sowie die an-

deren Geräte (rechts) eingeführt. Nach Luftinsufflation der Bauchhöhle wurde ein dritter Trokar mit Kanüle (Innendurchmesser 5 mm) in der Medianen zwischen den beiden anderen Geräten eingebracht. Das Sperma wurde in eine 30 cm lange Glaspipette mit auf 0,04 mm Außendurchmesser ausgezogener Spitze aufgezogen und die Pipette anschließend mit einer 1 ml-Spritze verbunden. Die Pipette wurde durch die Kanüle in der Medianen in das Uterushornlumen eingeführt und das Sperma deponiert.

12 Stunden nach Östrusbeginn übertrugen SCHIEWE et al. (1984), ebenfalls mittels Laparoskopie, 0,1 bis 0,2 ml Frischsperma in jedes Uterushorn. Die Methode entsprach dabei der zum Transfer von Embryonen verwendeten (siehe 2.9.).

1986 führten MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN 48 Stunden nach Entfernung der Progesteronschwämme Besamungen unter Laparoskopie durch. Zunächst erfolgte das Eingehen mit einer Verreskanüle in Nabelhöhe ca. 3 cm paramedian und die Anlage eines Pneumoperitoneums mit 4-6l CO₂. Dann wurde handbreit kaudal des Nabels und 3 cm paramedian das Laparoskop eingeführt. Zur Fixation der Uterushörner wurde gegenüberliegend in gleicher Höhe ein Zangentrokareingestochen und das Schaf im Winkel von 45° mit dem Kopf nach unten gelagert. Nach einer weiteren Trokarisierung des Abdomens 1-3 cm kranial des Euters und 2 cm paramedian wurde ein Embryotransferkatheter mit dem darin aufgezogenen Sperma durch eine Follikelpunktionskanüle aus der Humanmedizin in das Lumen des fixierten Uterushornes vorgeschoben und pro Horn 50-100 µl Frischsperma abgesetzt. Nur die Penetrationsstellen für Optik und Fixationsgerät wurden durch eine Naht versorgt. Die Durchführung dieser Besamung fand am sedierten Tier nach Epiduralanästhesie statt.

2.4. Ergebnisse nach Superovulation

Nach Superovulation beträgt die durchschnittliche Anzahl der Corpora lutea pro Schaf ca. 9 (ZANWAR und DESHPANDE 1984), jedoch mit sehr großen Variationen zwischen 4,6 (SMORAG et al. 1982) und 23,6 (ARMSTRONG und EVANS 1983). Im Mittel werden ca. 4 Embryonen gefunden (ZANWAR und DESHPANDE 1984) wobei sich die Variationsbreite zwischen 1,5 (SMORAG et al. 1982) und 7,7 (SMITH 1984) morphologisch intakten Embryonen bewegt (Tab. 2).

Tab. 2: Im Durchschnitt pro Schaf gefundene Corpora lutea, gewonnene Embryonen und Embryogewinnungsrate (EGR) bei verschiedenen Autoren

Anzahl Schafe	benutztes Hormon	Anzahl C.l.	Anzahl Embryonen	EGR*** %	Literatur
13	PMSG	7,7	3,5		ARMSTRONG und EVANS (1983)
19	FSH	8,4	5,3		ARMSTRONG und EVANS (1983)
47	FSH/PMSG	7,8	5,6	71,9	BODE (1985)
16	FSH	10,1			COGNIE et al. (1985)
21	FSH		4,1*		MERRY et al. (1984)
18	FSH	12,1	7,7	64,1	SMITH (1984)
55	PMSG	5,1*	3,6*	70	SMORAG et al. (1982)
41	FSH	6*	4,5*	75,8	TORRES und COGNIE (1984)
187	HAP	9,5		68	TROUNSON und MOORE (1974)
14	FSH	7,5*	4,7*	62	WRIGHT et al. (1981)
14	FSH/LH	8,9*	6,2*	70	WRIGHT et al. (1981)
87	PMSG	8,5*	4,1*	48,7	ZANWAR und DESHPANDE (1984)
24	PMSG	4,9*	4*	82,9	TERVIT und HAVIK (1976)
19	PMSG	7*	5,1*	72,9	TERVIT und HAVIK (1976)
8	PMSG	*1. 7,8**	2,7	35	MC KELVEY et al. (1986)
		*2. 2,1	1,6	76	MC KELVEY et al. (1986)
		*3. 4	2,6	66	MC KELVEY et al. (1986)

* aus angegebenen Absolutzahlen errechnet

** 1./2./3. Spülung

*** Embryonen + Oozyten / Corpora lutea (%)

Es hat sich gezeigt, daß weniger die Art und Menge der verabreichten Hormone (ARMSTRONG und EVANS 1983; COGNIE und TORRES 1984; COGNIE et al. 1985; WRIGHT et al. 1981), als vielmehr die Rasse und bei saisonalen Tieren die Jahreszeit entscheidend für die erzielten Ergebnisse sind (ARMSTRONG und EVANS 1983; BODE 1985). Jedoch treten auch innerhalb einer Rasse, trotz gleicher Behandlungsschemata, sehr große individuelle Variationen der Ergebnisse nach Superovulation bzw. bei der Gewinnung der Embryonen auf (TORRES et al. 1987).

Bei Untersuchungen von TORRES et al. (1987) waren während der Paarungssaison 74,48 % der an Tag 6 gewonnenen Embryonen übertragbar. Dieser Wert sank außerhalb der Paarungssaison auf 40,6 % ab, d.h. es wurden statt 6,3 übertragbarer Embryonen pro Schaf nur mehr 2,8 gefunden. Trat der Östrus innerhalb von 24 Stunden nach Schwammentnahme auf, konnten bei 6,6 Corpora lutea 4,8 brauchbare Embryonen gewonnen werden, nach Östrusbeginn innerhalb von 36 Stunden nach Entfernung des Schwammes wurden 5 Corpora lutea und 3,1 gute Embryonen gefunden. Beginn der Östrus 48 Stunden nach Schwammentfernung wurden 2 Corpora lutea pro Schaf gezählt und 0,6 brauchbare Embryonen gewonnen. Die Eigewinnungsrate betrug 71,5 bzw. 63 und 30 %. Während 71 % der gefundenen Embryonen junger Tiere übertragbar waren, konnten bei älteren Tieren nur 59 % der gewonnenen Embryonen zu einem Transfer verwendet werden. Da die älteren Schafe aber eine höhere Ovulationsrate aufwiesen, wurden hier 5,4 geeignete Embryonen pro Schaf, im Gegensatz zu 4,8 bei den jungen Tieren, gefunden.

Schafe mit sehr hoher Ovulationsrate (>16) neigen zu einer erhöhten Rate unbefruchteter Eizellen (ARMSTRONG und EVANS 1983; EVANS und ARMSTRONG 1984).

Nach Natursprung kann die Befruchtungsrate im Durchschnitt zwischen 54,1 (BODE 1985) und 95,4 % (ARMSTRONG und EVANS 1984) liegen, wobei Variationen von 0-100 % auftreten.

Ähnliche Befruchtungsergebnisse erzielten ARMSTRONG und EVANS (1984) nach zervikaler (80,6 %) oder intrauteriner (83,3 %) Besamung mit Frischsperma. Eine zervikale Insemination mit Tiefgefriersperma führte zu 11 %, eine laparoskopische intrauterine Besamung zu 50 % befruchteter Eizellen. MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN (1986) erreichten eine Befruchtungsrate von 93,7 % nach laparoskopischer intrauteriner Insemination mit Frischsperma.

Schlechte Befruchtungsergebnisse bei superovulierten, im Natursprung gedeckten Schafen können ihre Ursache in mangelhafter zervikaler Spermienpassage und Störungen des Spermatransportes im unteren Abschnitt der Tuba uterina haben, d.h. durch Zusammen treffen dieser Faktoren wird eine zeitgerechte Begegnung der Gameten im Eileiter verhindert (MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN 1986). So konnten EVANS und ARMSTRONG (1984) eine signifikante Verminderung der Anzahl rückgewonnener Spermien in Uterus und Ovidukt nach FSH- und PMSG-Stimulation feststellen. Ebenso werden Dyskorrelationen in der Progesteron/Östrogenkonzentration, hervorgerufen durch persistierende Follikel in Betracht gezogen. Hierbei soll die Befruchtungsfähigkeit der Eizelle durch Störungen im Eireifungsprozeß, sowie die Befruchtungsfähigkeit von Eizelle und Sperma durch Veränderungen im Tubenmilieu gesenkt werden (MEINECKE-TILLMANN et al. 1983).

2.5. Wachstum der Embryonen

Der Eintritt der Embryonen in den Uterus erfolgt an Tag 2 bis 4 der Gravidität (MC LAREN 1978). Embryonen im Stadium der Morula bzw. Blastozyste können durch Spülen des Uterus an Tag 6 bis 8 (Tag 0 $\equiv$ Östrusbeginn) gewonnen werden (TORRES und COGNIE 1984; WILLADSEN 1977). Ihr Durchmesser beträgt 130 bis 150 μ (POLGE 1977). Die Morula des Schafes hat ca. 30 Zellen (WILLADSEN et al. 1976; WILLADSEN 1977) bzw. 16 bis 64 (ROWSON und MOOR 1966), eine frühe Blastozyste 60 bis 120 Zellen und eine geschlüpfte Blastozyste ca. 200 Zellen (WILLADSEN 1977).

Das Alter der Morulae schwankt zwischen 112 und 128, das der Blastozysten zwischen 128 und 224 Stunden (Stunde 0 $\equiv$ Östrusbeginn; ROWSON und MOOR 1966).

Ab dem 12. Tag der Gravidität beginnt der Embryo extrem schnell zu wachsen und innerhalb von 24 Stunden entwickelt er sich von einer 1 mm großen Blastozyste zu einem Embryo mit einem 11,7 mm langen Chorion. Am 14. Tag hat das Chorion bereits eine Länge von 102,3 mm. Im Gegensatz dazu wächst der Embryo selbst während dieser Zeit kaum. Das außerordentliche Wachstum zwischen dem 12. und 14. Tag beginnt zu der Zeit, wo das Fortbestehen des Corpus luteum vom Vorhandensein eines aktiven Conceptus im Uterus abhängig wird (ROWSON und MOOR 1966).

Die Implantation findet beim Schaf an Tag 15 bis 16 der Gravidität statt. Eine Trächtigkeit dauert 145 bis 155 Tage (MC LAREN 1978).

2.6. Gewinnung von Embryonen

Zur Gewinnung von Embryonen aus dem Eileiter verwendeten HUNTER et al. (1955) eine retrograde Spültechnik, bei der das Medium durch eine Kanüle am Übergang zwischen Eileiter und Uterushorn eingebracht wurde. Der Abfluß erfolgte durch die Eileiter über eine in das Infundibulum tubae eingeführte gebogene Glaskanüle von 2 mm Durchmesser. Beide Kanülen wurden jeweils zwischen zwei zusammengepreßten Fingern festgehalten und so der Eileiter auf beiden Seiten verschlossen.

Für die Gewinnung von Embryonen aus dem Uterus benutzten die gleichen Autoren folgende Spültechnik: In die Uterushornbasis, die durch Zusammenpressen zwischen zwei Fingern verschlossen wurde, verbrachten sie eine 1,4 mm dicke Kanüle, die dem Abfluß des Mediums diente. Durch eine zweite, kleinere Kanüle in der Uterushornspitze wurde das Medium in Richtung Uteruskörper gespült und über das freie Ende der dickeren Kanüle aufgefangen. Die Embryogewinnungsrate betrug 58 %.

Um die bei dieser Technik immer wieder aufgetretenen starken Verwachsungen zu vermeiden, verschlossen TERVIT und HAVIK (1976) die Basis des jeweiligen Uterushornes mit einem Ballonkatheter, über den das Medium in eine Petrischale abfließen konnte. Für das Einbringen des Mediums über die Uterushornspitze benutzten sie eine stumpfe 20-Gauge-Kanüle und erzielten eine Eigewinnungsrate von 82,9 %.

SMITH und MURPHY (1984) richteten einen 20-Gauge-Venenkatheter mit Stahlkanüle in der Uterushornspitze in Richtung Eileiter und verschlossen diesen durch Zusammenpressen zwischen zwei Fin-

gern. Für den Verschuß der Uterushornbasis verwendeten sie einen 14-Gauge-Foleykatheter und füllten den Ballon mit 3-5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Sie erreichten mit ihrer Methode eine Embryogewinnungsrate von 65,3 %.

BODE (1985) gebrauchte zum Verschuß der Uterushornbasis einen Rüschkatheter Nr. 8, über den er das Medium in einer Petrischale auffing. Eingbracht wurde das Medium über eine Knopfkanüle in der Uterushornspitze, die in Richtung Basis wies. Er konnte damit 71,9 % der Embryonen gewinnen.

ROWSON et al. (1969) beschrieben eine retrograde Spülmethode des Uterus beim Rind, die WRIGHT et al. (1981) für das Schaf übernahmen. Hierbei wurde ein biegsames Plastikröhrchen über das Infundibulum tubae oder direkt in den Eileiter eingeführt und die Uterushornbasis der ipsilateralen Seite mit einer Klemme verschlossen. Zunächst wurde Medium in die Uterushornspitze, dann in die Uterushornbasis eingebracht und über das Plastikröhrchen aufgefangen. Mit diesem Verfahren wurde eine Embryogewinnungsrate von 62,2 % erzielt.

Alle bisher beschriebenen Methoden setzen eine Laparotomie oder eine Schlachtung des Schafes voraus. Im Gegensatz dazu konnten CAPEHART et al. (1984) mittels Laparoskopie bei 27 Spülungen von 8 Schafen mit 37 beobachteten Corpora lutea 17 Embryonen gewinnen, was einer Embryogewinnungsrate von 45,9 % entspricht. Zu Beginn des Eingriffs wurden 4 l CO₂-Gas in die Bauchhöhle gepumpt, dann das Laparoskop eingeführt, die Uterushornspitzen mit einer Gewebepinzette gefaßt und schließlich durch einen 2,5 cm langen Schnitt in der Linea alba vorgelagert. Das Medium wurde mittels eines 18-Gauge-Venenkatheters in die Uterushornspitzen

einggebracht und über ein steriles Plastikspekulum durch die Zervix ausgepreßt.

MC KELVEY und ROBINSON (1986) bzw. MC KELVEY et al. (1986) legten zunächst die seit 36 Stunden ausgenüchternen Tiere in Vollnarkose in einem Winkel von 45° mit dem Kopf nach unten ab. Anschließend erfolgten zwei Einschnitte von 2 cm Länge beidseits der Medianen, ca. 10 cm vor dem Euter, um mit Endoskop und Pinzette eingehen zu können. Nach Insufflation der Bauchhöhle mit CO₂ wurden die Ovarien aufgesucht und die Corpora lutea gezählt. Danach wurde ein dritter Einschnitt in der Mittellinie ca. 5 cm vor den beiden ersten Wunden vollzogen und ein Trokar mit Kanüle (Durchmesser 7 mm, Länge 7 cm) eingeführt. Der Trokar wurde sofort zurückgezogen und eine stumpfe 18-Gauge-Nadel durch die Stahlkanüle in das Abdomen eingebracht. Zunächst wurde das den Instrumenten zugewandte Horn so weit wie möglich kaudal der Uterusbifurkation fixiert und die Uteruswand mit der stumpfen Nadel (Durchmesser 0,25 cm) durchstoßen. Dann wurde auch die stumpfe Nadel entfernt und ein Latex-2-Weg-Foley-Blasenkatheter (10 FG; 25 cm lang; 3 ml Ballon) mit Mandrin zur Verstärkung durch die Stahlkanüle in das Uteruslumen vorgeschoben. Der Ballon wurde mit 5-7 ml Luft gefüllt und die Pinzette nach der so erfolgten Fixation des Foley-Katheters zur Fixation des Uterushorns am uterotubalen Übergang benutzt. Schließlich wurde mit Hilfe eines Venenkatheter-Sets (166x13,3 mm) in der Medianen ca. 6 cm vor dem Euter durch die Bauchdecke gestoßen und dieses in Richtung uterotubale Verbindung gelenkt. Sodann wurde die Katheterspitze so nah wie möglich am Ovidukt eingebracht und der Mandrin entfernt. Pro

Horn wurden so 60 ml Medium und 30 ml Luft eingebracht. Jedes von 8 Schafen wurde 3 mal gespült. Bei der 1. Spülung wurden 62 Corpora lutea und 22 Embryonen (50 % befruchtet), bei der 2. Spülung 17 Corpora lutea und 13 Embryonen (100 % befruchtet) und bei der 3. Spülung 32 Corpora lutea und 21 Embryonen (71 % befruchtet) gefunden.

COONROD et al. (1986) versuchten 26 mal eine Spülung über die Zervix, was jedoch nur in 14 Fällen gelang. Hierbei fanden sie insgesamt 62 Embryonen. Sie führten zunächst ein Spekulum mit Kaltlichtquelle in die Vagina ein, fixierten dann die Zervix mit Alligatorpinzetten und entfernten das Spekulum wieder. Anschließend wurde die Zervix nach kaudal gezogen, ein Humanspekulum in die Vagina eingeführt und ein Foleykatheter in den Uterus geschoben. Letztere Manipulation wurde durch einen in das Rektum eingeführten Finger unterstützt. Bis zu 20 mal wurden 5 bis 20 ml Medium über den Katheter eingebracht und in einer Sammelflasche wieder aufgefangen.

MUTIGA et al. (1983) legten bei 6 Schafen nach Laparotomie am Tag 9 des Zyklus pro Uterushorn einen Dauerkatheter. Nach Superovulation und Besamung mittels dieser Katheter wurden die Tiere an Tag 3 und 4 des folgenden Zyklus mehrmals gespült. Dabei konnte 1 Oozyte gewonnen werden. Nach Schlachtung am 5. Tag wurden insgesamt 37 Follikel an den Ovarien gezählt. Bei 3 herkömmlich über die Zervix besamten Kontrollschafen konnten nach Schlachtung am 5. Tag der Gravidität 9 Embryonen und 5 Oozyten gewonnen werden.

2.7. Spülmedien

Bei der Gewinnung der Embryonen finden als Spülmedien u.a. Schafserum (KILLEEN 1976; TERVIT und HAVIK 1976), PBS oder mPBS mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen und Serumarten, wie z.B. Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum = FCS), Lammserum und Serum von neugeborenen Lämmern (BUNCH et al. 1984; SMITH und MURPHY 1984; TERVIT und GOOLD 1984; WILLADSEN et al. 1976; ZANWAR und DESHPANDE 1984), KRBL (BONDIOLI und WRIGHT 1983; WILLADSEN et al. 1976), HAM'S F10 (WRIGHT et al. 1981) sowie TCM-199 (Tissue Culture Medium) mit 10 % FCS (TORRES und COGNIE 1984) bzw. ohne Serum (WRIGHT et al. 1976) Verwendung. Die Temperatur der Spülmedien beträgt +37°C (SMORAG et al. 1982).

2.8. Kultur frischer Embryonen

BETTERBED und WRIGHT (1981) benutzten BPM-Medium (Brinsters Pyruvat Medium) mit 1,5 % BSA + 1 % "Antibiotic/Antimycotic" (siehe Seite 48) für ihre Kultur und begasten die Tropfen unter Öl mit 5 % CO₂ in Luft oder mit 90 % N₂, 5 % CO₂ und 5 % O₂. Von 104 Einzellern teilten sich 38 bis zum Stadium der Morula bzw. der kompaktierten Blastozyste. Bei 50 % der Einzellern befand sich zusätzlich 0,1 % Glukose im Medium und es entwickelten sich 34 der 52 Embryonen (64,5 %) wogegen ohne Glukose nur 4 von 52 (7,7 %) weiterwuchsen.

Bei BOONE et al. (1978) wuchsen 2 % der 1- bzw. 2-Zeller in Brinstermedium für Schafe (BMOC 2) über das 8-Zellstadium hinaus.

HEYMAN et al. (1987) verglichen die Entwicklung von 144 Einzellern in vier verschiedenen Medienzusammensetzungen nach 3 Tagen Kultur bei +38°C und 5 % CO₂, 5 % O₂ sowie 90 % N₂ in 500 µl-großen Mediumtropfen. In B2-Medium entwickelten sich 14 von 49 Embryonen zu Morulae (29 %). Wurde zusätzlich 15 % FCS beigegeben, stieg die Entwicklungsrate auf 35 % (15 von 43). Bei Kokultur mit Trophoblastvesikeln von Schafen wuchsen von 28 Einzellern 19 bis zur Morula (68 %) und bei Zusatz von Kälberserum 18 von 24 (75 %). Die benutzten Trophoblastvesikel wurden von elongierten Blastozysten des Schafes an Tag 12 der Gravidität gewonnen. Von 29 auf Rezipienten übertragenen Morulae wurden 23 nach 3 Tagen wiedergefunden. 9 (40 %) hatten sich zur expandierten oder geschlüpften Blastozyste weiterentwickelt.

An Tag 5 bis 6 nach Östrusbeginn gewannen BUNCH et al. (1984) 40 Morulae und 34 beginnende Blastozysten. Nach Kultur in PBS + 20 % Serum wuchsen von den Morulae 15 (37,5 %) bis zur expandierten Blastozyste, von den beginnenden Blastozysten 17 zur expandierten und 7 weitere zur geschlüpften Blastozyste (70,6 %).

PETERS und CUPPS (1977) verwendeten TCM-199 (Tissue Culture Medium) mit 0,5 oder 1,5 % BSA. Es entwickelten sich von 28 1- bis 4-Zellern 9 (32 %) zu Morula oder Blastozyste, von 30 8-Zellern jedoch 24 (80 %) zu Morula oder schlüpfender Blastozyste.

2.9. Transfer frischer Embryonen

2.9.1. Synchronisation der Empfänger und Anzahl Übertragener Embryonen

Die Zyklen der Empfängertiere werden mit Schwankungen von $\pm 12-24$ Stunden oder aber genau (± 0 Stunden) auf die Zyklen der Spendertiere synchronisiert (ARMSTRONG und EVANS 1983; TERVIT et al. 1972; ZANWAR und DESHPANDE 1984). MOORE (1970) sowie TERVIT und ROWSON (1972) akzeptierten auch noch Rezipienten, deren Östrus bis zu 48 Stunden nach dem der Spender gelegen war.

MOORE und SHELTON (1962) verwendeten nur Empfänger, deren Zyklen ± 24 Stunden mit denen der Spenderschafe synchron waren. Die Rate geborene/übertragene Lämmer betrug nach intrauterinem Transfer je eines Embryos pro Empfänger 63 %, nach Transfer zweier Embryonen pro Schaf 58 % und nach Transfer dreier Embryonen pro Schaf 51 %. Die Trächtigkeitsraten lagen bei 63, 74 und 92 %. Wurden 1,2 oder 3 Embryonen in die Eileiter übertragen, lagen die Trächtigkeitsraten bei 28, 74 und 58 %, die Raten geborene/übertragene Lämmer bei 28, 50 und 31 %.

ARMSTRONG und EVANS (1983) erreichten nach Transfer eines bzw. zweier Embryonen pro Schaf Geburtsraten von 35,1 bzw. 31,5 %.

2.9.2. Transfer von 4- bis 16-Zellern

1955 übertrugen HUNTER et al. nach Laparotomie am vorgelagerten Uterus 4-16 Zeller in die Uterushornspitze der Empfänger-schafe. Dazu verwendeten sie fein ausgezogene Pasteurpipetten, die mittels eines Gummiverbindungsstückes mit einer kleinen Spritze verbunden waren. 19 Embryonen wurden mit einem Minimum an Me-

dium übertragen und 8 Lämmer geboren.

ROWSON und ADAMS (1957) verwendeten die gleiche Transfer-technik. Sie übertrugen 15 4- bis 8-Zeller auf 7 Schafe. 10 Lämmer wurden geboren.

Bei ARMSTRONG und EVANS (1983) entwickelten sich nach der Übertragung von 5- bis 8-Zellern 28 % der Embryonen zu Lämmern, jedoch 38 % nach Transfer von 9- bis 16-Zellern. Von den übertragenen 2- bis 4-Zellern wurde kein Lamm geboren.

TERVIT und ROWSON (1974) gelang es, aus dem Transfer von 60 1- bis 4-Zellern nach 3 bis 6 Tagen Kultur in SOF (synthetischer Oviduktflüssigkeit) unter Begasung mit 5 % CO_2 , 5 % O_2 und 90 % N_2 13 Lämmer (21,6 %), aus 22 8-Zellern nach 3- bzw. 4-tägiger Kultur 12 Lämmer (54,5 %) zu erhalten. Sie übertrugen pro Uterushorn einen Embryo.

Mittels Laparoskopie übertrugen MC KELVEY und ROBINSON (1984) 4 Tage alte Embryonen (Tag 0 $\equiv$ Östrus). Dazu wurden die Empfängertiere kopfüber in einem Winkel von 45° gelagert und 2 Einschnitte je 3 cm seitlich der Linea alba und 10 cm kranial des Euters durchgeführt. Nach Insufflation der Bauchhöhle mit CO_2 und Zählen der Corpora lutea wurde das geeignete Uterushorn mit einer Pinzette bei ca. halber Länge festgehalten. Die Embryonen wurden paarweise in einen PVC-Katheter (No. 4 French Gauge) mit aufgesetzter 1 ml-Spritze aufgezo-gen. In der Medianen, direkt kranial des Euters wurde eine 3 cm lange Inzisur durchgeführt, durch diese eine 11 cm lange, stumpfe 18 G-Stahlnadel in das Abdomen eingebracht und die Wand des Uterushornes perforiert. Anschließend wurde der, in der Stahlnadel befindliche PVC-Katheter ca. 2 cm in das Lumen des Uterushornes vorgeschoben, wieder 1 cm

zurückgezogen und die Embryonen ausgepreßt. Von 6 Rezipienten wurden 2 trächtig und gebaren 3 Lämmer.

WALKER et al. (1985) gewannen 4 Tage alte Embryonen und bewahrten sie bis zum Transfer bei Raumtemperatur in hepesgepufferter SOF (synthetische Oviduktflüssigkeit) mit 10 % hitzeinaktiviertem Schafserum auf. Für den Transfer wurden die Schafe in einem Winkel von 50° kopfüber gelagert. Nach Erzeugung eines Pneumoperitoneums wurde das Laparoskop (Außendurchmesser ca. 6,5 mm) mit Hilfe eines Trokars mit Kanüle (Außendurchmesser 7 mm) ca. 4 cm links der Medianen eingeführt. Auf der rechten Seite, ebenfalls ca. 4 cm neben der Linea alba, wurde ein zweiter Trokar (Außendurchmesser 5 mm) mit Kanüle eingebracht. Die paarweise in 20 µl Medium aufgezogenen Embryonen wurden kranial der Uterusbifurkation in einem Uterushorn deponiert. Von 54 Rezipienten wurden 22 trächtig, 10 Lämmer wurden geboren und 16 Feten nach Schlachtung zwischen dem 30. und 90. Tag der Gravidität gezählt.

2.9.3. Transfer von Morulae und Blastozysten

Bei einem Transfer von Morulae oder Blastozysten unmittelbar nach der Gewinnung wurden bis zu 64,5 % Lämmer aus den übertragenen Embryonen geboren (KILLEEN 1976). Jedoch werden auch geringere Zahlen wie 16,7 % (SCHIEWE et al. 1984), 35,5 % (ZANWAR und DESHPANDE 1984) und 50 % (ARMSTRONG und EVANS 1983; SCHIEWE et al. 1984) beschrieben.

Ebenfalls mit Laparoskopie, aber am stehenden Schaf führten MUTIGA und BAKER (1984) den Transfer von 6 Embryonen auf 3 Schafe durch. 3 Lämmer wurden geboren. Nach Sedation und Epiduralanästhesie sowie Lokalanästhesie um die Schnittwunden erfolgte beid-

seits je 3 cm kranioventral des Tuber coxae ein ca. 2 cm langer Schnitt. Auf der linken Körperseite wurde dann ein Trokar mit Kanüle in die Bauchhöhle eingeführt und der Trokar wieder zurückgezogen, durch die verbleibende Kanüle das Laparoskop eingebracht und damit die Corpora lutea ermittelt. Die Bauchwand wurde nun auch auf der rechten Körperseite mit dem Trokar durchstoßen, dieser wiederum zurückgezogen und durch die entstandene Öffnung eine Pinzette zur Fixierung des ipsilateralen Uterushornes eingeführt. Anschließend erfolgte die Perforation der Uteruswand mittels einer durch das Laparoskop eingeführten Stahlnadel. Durch diese wurde eine Plastikkanüle mit aufgesetzter 3 ml-Spritze ca. 5 cm weit in das Uterushorn vorgeschoben und die darin aufgezogenen Embryonen deponiert.

TORRES und COGNIE (1984) gewannen Embryonen an Tag 6 nach Östrusbeginn und kultivierten sie zunächst für 1 bzw. 5 Stunden bei 20° und 37°C in B2-Medium oder TCM-199. Nach anschließender Übertragung der insgesamt 193 Morulae und Blastozysten entwickelten sich 31 Lämmer. Das Verhältnis von geborenen zu übertragenen Lämmern schwankte in den einzelnen Versuchsgruppen zwischen 17 und 50 %. Sie verwendeten zum Transfer die von HUNTER et al. (1955) beschriebene Technik.

SCHIEWE et al. (1984) erzielten nach Transfer von 5 bis 6 Tage alten Embryonen eine Trächtigkeitsrate von durchschnittlich 33,3 %. Bis zum Transfer bewahrten sie die Embryonen in mPBS mit 20 % FCS bei +21 bis +25°C auf. Für die Laparoskopie wurden die Rezipienten kopfüber in einem Winkel von 45° gelagert. Nach Einführen einer Verreskanüle in den unteren rechten Quadranten in der Mitte zwischen Flanke und Nabel wurde mit 2 l CO₂ ein Pneu-

moperitoneum erzeugt. Durch einen 1 cm langen Schnitt in der Linea alba zwischen Nabel und Euter wurde ein Trokar A mit 10 mm Durchmesser in die Bauchhöhle eingebracht. Dieser Trokar wurde wieder entfernt und stattdessen ein Laparoskop eingeführt. Es folgte ein Trokar B mit 6 mm Durchmesser auf der Seite des Ovars mit Corpus luteum. Durch diesen Trokar B wurde eine Palmer-Pinzette für die Fixation des Uterushornes geschoben. Direkt ventral des fixierten Hornes wurde eine 16-Gauge-Teflonkathetereinheit mit 5,5 cm Länge durch die Bauchwand eingebracht und schließlich der Katheter vorsichtig in das Lumen des fixierten Uterushornes eingeführt. Nach Entfernung des Mandrins wurde ein dünnerer Katheter mit aufgesetzter 1 ml-Spritze und darin aufgezogenen Embryonen durch diesen hindurch in das Lumen des Uterushornes vorgeschoben und die Embryonen deponiert.

TORRES et al. (1987) übertrugen 188 Morulae auf 100 Empfängerschafte. Die Embryonen wurden chirurgisch mit einem Katheter und aufgesetzter Spritze in das kraniale Drittel des Uterushorns verbracht. Pro Uterushorn wurde jeweils 1 Embryo übertragen und zwar unabhängig vom Auftreten der Corpora lutea. 73 Schafe lammten ab. 124 Lämmer wurden geboren.

2.10. Tiefgefrierkonservierung

2.10.1. Tiefgefriermedium und Gefrierschutzmittelzugabe

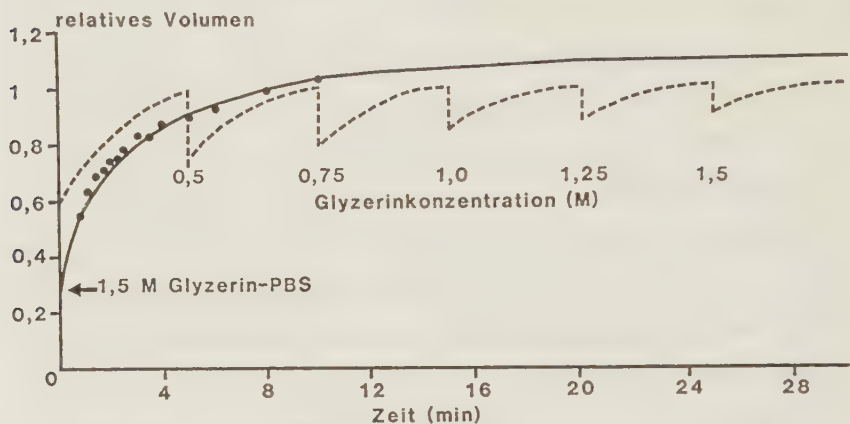
Für die Tiefgefrierkonservierung werden Embryonen an Tag 5 bis 8 nach dem Östrus bzw. Deckakt im Morula- bis Blastozysten-

stadium gewonnen (BILTON und MOORE 1976; MERRY et al. 1984; WILLADSEN et al. 1974). Als Tiefgefriermedium dient dabei PBS bzw. mpBS (WHITTINGHAM 1971), eventuell mit Schafserum oder BSA (BILTON und MOORE 1976; MERRY et al. 1984; WILLADSEN et al. 1974; WILLADSEN et al. 1976).

Embryonen überleben ein Tiefgefrieren nur bei Zusatz von Gefrierschutzmitteln (SCHNEIDER 1984). Als solche können u.a. Glycerin, DMSO, Äthylenglykol (TERVIT und GOOLD 1984) sowie Propylenglykol (SCHIEWE et al. 1985) dienen. Für alle diese Stoffe ist der Embryo permeabel (NIEMANN 1983). D.h.: gibt man eines der genannten Gefrierschutzmittel zu dem Medium das den Embryo enthält, wird dieses hyperosmotisch. Deshalb schrumpft der Embryo zunächst durch Dehydratation, da er für Wasser besser permeabel ist als für das Gefrierschutzmittel. Der Schrumpfungsprozeß hält an, bis sich Wasserefflux und Gefrierschutzmittelinflux entsprechen (SCHNEIDER und MAZUR 1984). Das Eindringen des Gefrierschutzmittels in den Embryo ist abhängig von der Konzentration sowie von Zeit und Temperatur. Je höher die Temperatur des Mediums und die Konzentration des darin enthaltenen Gefrierschutzmittels ist, desto mehr kann die Zelle in einer bestimmten Zeit aufnehmen. Mit dem Gefrierschutzmittel fließt gleichzeitig Wasser in die Zelle zurück und deren Umfang nimmt wieder zu. Die Äquilibrierung ist vollständig, wenn sich der Embryo wieder im isotonen Zustand befindet (LEIBO und MAZUR 1978; SCHNEIDER und MAZUR 1984).

Die Zugabe des Gefrierschutzmittels kann auf einmal (SCHNEIDER und MAZUR 1984; Abb. 1) oder in 2-5 Schritten mit jeweils 5-30 Minuten Äquilibrierungszeit bei Raumtemperatur (ca.

+20°C) oder bei +30°C durchgeführt werden (BILTON und MOORE 1976; TERVIT und GOOLD 1984; WILLADSEN et al. 1977; Abb. 1).



nach SCHNEIDER und MAZUR 1984

Abb. 1: Vergleich beobachteter Volumenveränderungen (●) von Rinderblastozysten (Tag 7) nach einmaliger Zugabe von 1,5 M Glyzerin-PBS-Medium mit, anhand eines Permeabilitätskoeffizienten $P = 0,2 \times 10^{-3}$ cm/min computererrechneten, Volumenveränderungen nach einmaliger (—) oder schrittweiser (---) Zugabe von Glyzerin-PBS-Medium bei +23°C

Die Endkonzentration von Glyzerin im Medium beträgt meist 1,0 bis 1,5 Mol/l, manchmal bis zu 2,8 Mol/l (WARE und BOLAND 1987; SCHIEWE et al. 1985). Bei anderen Gefrierschutzmitteln wie DMSO, Äthylenglykol (TERVIT und GOOLD 1984) und Propylenglykol (SCHIEWE et al. 1985) wird eine Konzentration von 1,5 Mol/l verwendet.

Nach Gefrierschutzmittelzugabe werden die Embryonen entweder einzeln oder bis zu 6 gemeinsam (WARE und BOLAND 1987) in Glasampullen (SCHIEWE et al. 1985), Röhrchen (WILLADSEN et al. 1977) oder 0,5 ml-Pailletten (WARE und BOLAND 1987), beim Rind auch in 0,25 ml-Pailletten (LEIBO 1984) verbracht und der Gefriervorgang eingeleitet.

2.10.2. Einfriervorgang und Seeding

Kühlt man Zellen, die sich in einem wässrigen Medium befinden auf Temperaturen um den Gefrierpunkt ab, so beginnt die Eiskristallisation zuerst in der extrazellulären Lösung (LEIBO und MAZUR 1987).

Um ein thermodynamisches Gleichgewicht zu erhalten, muß die extrazelluläre Flüssigkeit in dem Maße konzentrierter werden, in dem die Temperatur sinkt. Bei Temperaturen, die über -10°C liegen, verhütet die Zellmembran die Passage von extrazellulären Eiskristallen in die Zelle. Als Folge davon ist der Inhalt der Zelle einem "Supercooling" unterworfen (MAZUR 1966). Das "unterkühlte" Wasser in der Zelle hat ein höheres chemisches Potential als das Wasser der teilweise gefrorenen extrazellulären Flüssigkeit. Deshalb fließt Wasser aus der Zelle und gefriert extrazellulär. Die folgenden physikalischen Vorgänge in der Zelle hängen von der Kühlrate ab (MAZUR 1977). Ist diese langsam genug, kann die Zelle durch Exosmose schnell genug Wasser verlieren, so daß durch die resultierende Konzentration der intrazellulär gelösten Stoffe ein "Supercooling" vermieden wird und das chemische Potential von intra- und extrazellulärem Wasser im Gleichgewicht ist. Als Folge davon dehydriert die Zelle und gefriert intrazel-

lulär nicht. Wird die Zelle zu schnell gekühlt, kann sie das Wasser nicht schnell genug verlieren um ein Äquilibrium zu erhalten, d.h. sie unterkühlt immer mehr und gefriert schließlich intrazellulär (MAZUR 1966; MAZUR 1977).

Bei sehr hohen Kühlraten entstehen sehr kleine Eiskristalle, die die Zelle aufgrund ihrer geringen Größe nicht stören, jedoch infolge ihres hohen Oberflächen/Volumenverhältnisses sehr instabil sind (MAZUR 1966).

In praxi kühlt man die Proben zunächst auf $-2,5^{\circ}$ bis -10°C d.h., eine Temperatur kurz unter dem eigentlichen Gefrierpunkt der Lösung (bei 1,5 M DMSO in isotonischen Salzlösungen z.B. $-3,5^{\circ}\text{C}$; BILTON und MOORE 1976; LEIBO und MAZUR 1978), bei der die Proben noch nicht spontan gefrieren und induziert die Kristallisation durch das sogenannte "Seeding".

Seeding bedeutet künstliches Auslösen der Kristallisation, z.B. mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Klemme (HEISE 1979) oder Glaspipette (BRAUN 1977), einem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kupferstück (CHUPIN et al. 1984), einem Stück gefrorenen Mediums (BILTON und MOORE 1976) oder indem für 4 (MASSIP et al. 1982) bzw. 15 Sekunden Stickstoff auf die Probe geblasen wird (NIEMANN 1985).

Beim Seeding erwärmt sich die Probe geringfügig. Hält man die Temperatur in der Umgebung (Alkoholbad, automatisches Tiefgefriergerät) in dieser Zeit konstant, sinkt die Temperatur in der Probe selbst in der Folge sehr viel weniger, als wenn unterkühlte Proben spontan gefrieren. Werden die Proben nach dem Seeding mit optimaler Kühlrate weitergekühlt, d.h. bei Säugerembryonen mit $0,2^{\circ}$ bis $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$, können sie durch Eisbildung und steigende Lö-

sungskonzentrationen im Gleichgewicht bleiben (LEIBO und MAZUR 1978). Sind die Zellen einmal im Gleichgewicht mit der teilweise gefrorenen extrazellulären Lösung, können sie auf tiefere Temperaturen weitergekühlt werden. Die Kühlrate muß dabei so langsam sein, daß die Zellen immer relativ im osmotischen Gleichgewicht bleiben, bis das ganze System - Zelle und Lösung - völlig erstarrt ist (LEIBO und MAZUR 1978).

1974 kühlten WILLADSEN et al. Embryonen zunächst in 10 bis 20 Minuten von +20°C bis 0°C ab, gaben sie in ein Alkoholbad von -6°C, lösten die Kristallisation aus und kühlten dann mit 0,3°C pro Minute auf Endtemperaturen von -65° bis -90°C ab.

1976 hielten WILLADSEN et al. die Röhrchen mit den Embryonen für 5 bis 10 Minuten bei 0°C, gaben sie dann für 2 Minuten in eine Umgebung von -6° oder -7°C, und kühlten nach erfolgtem Seeding mit 0,3°C/min auf Temperaturen von -65° und -70°C oder -125° und -130°C ab.

Heute werden Schafembryonen mit 1°C/min von +20°C bis -7°C gekühlt bzw. die Embryonen direkt in -7°C gegeben und dann die Kristallisation durch Seeding ausgelöst. Anschließend wird mit 0,3°C/min auf Temperaturen von -30° bis -60°C weitergekühlt. Bei diesen Temperaturen erfolgt sodann das Verbringen der Embryonen in flüssigen Stickstoff (MERRY et al. 1984; TERVIT und GOOLD 1984; WARE und BOLAND 1987).

Jedoch wurden Embryonen auch bereits nach Abkühlung auf -15°C bzw. -20°C oder -25°C in Stickstoff gegeben (SCHIEWE et al. 1985) sowie ab -35° bzw. -65°C mit 0,1°C auf -38° bzw. -120°C gekühlt und dann in Stickstoff verbracht (TERVIT und GOOLD 1984; WILLADSEN et al. 1977).

2.10.3. Auftauen und Ausverdünnung der Embryonen

Bei schnellem Tauen, z.B. im Wasserbad von $+37^{\circ}\text{C}$, erreicht die Überlebensrate Höchstwerte, wenn mit $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ gekühlte Embryonen bei -35° bis -40°C in Stickstoff überführt wurden (SCHNEIDER et al. 1974; WHITTINGHAM et al. 1979). Schnelles Erwärmen erlaubt den Zellen also höhere Kühlraten zu überleben als langsames Erwärmen, da hierbei in der kurzen Zeit bis zum Erreichen des Schmelzpunktes kein Wachstum der Eiskristalle stattfinden kann, die bei schnellem Tiefgefrieren entstanden sind (MAZUR 1977). So überleben nur wenige Schafembryonen langsames Auftauen, wenn sie beim Einfrieren bereits bei -30° bis -45°C in flüssigen Stickstoff umgesetzt wurden (POLGE und WILLADSEN 1978).

Um nach langsamem Auftauen gute Überlebensraten zu ermöglichen, muß man den Kühlvorgang bis -60°C oder weiter fortsetzen, bevor man die Embryonen in flüssigen Stickstoff gibt (SCHNEIDER et al. 1974; WHITTINGHAM et al. 1979).

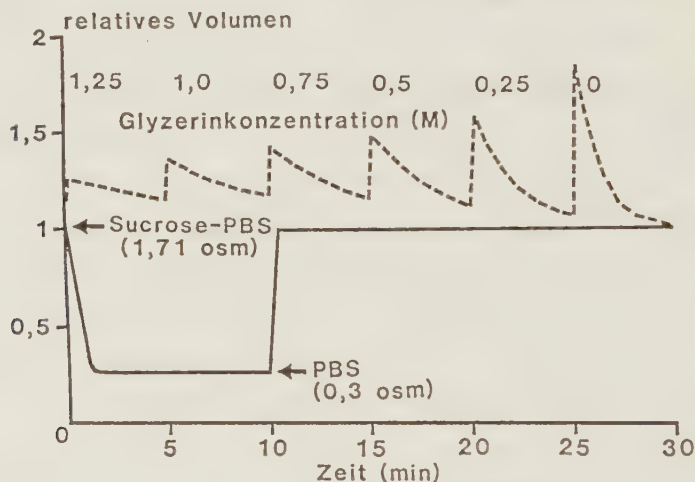
Das Auftauen der Embryonen kann in einem Wasserbad von $+37^{\circ}\text{C}$ stattfinden, entweder bis zum Schmelzen des Eises (Ampullen; TERVIT und GOOLD 1984) oder für 1 Minute, d.h. bis zur völligen Erwärmung (Pailletten; WARE und BOLAND 1987). Die Raten bei langsamem Auftauen schwanken zwischen 3° und 100°C pro Minute (MERRY et al. 1984; WILLADSEN et al. 1976).

Nach dem Auftauen muß das Gefrierschutzmittel wieder aus Embryo und Medium entfernt werden. Die Verdünnungsrate ist kritisch. Gibt man Embryonen, die vor dem Tiefgefrieren z.B. mit 1,5 M Glyzerin äquibriert wurden, direkt in isotonische PBS, schwellen sie an und zerplatzen aufgrund des schnellen Wasserin-

flux. Um diesen osmotischen Schock zu vermeiden, ist es üblich, Glycerin oder andere Gefrierschutzmittel schrittweise zu verdünnen, entweder durch Hinzufügen von PBS (WHITTINGHAM et al. 1979) oder durch Pipettieren der Embryonen in sukzessiv niedrigere Gefrierschutzmittelkonzentrationen (TERVIT und GOOLD 1984; Abb. 2). Die Folge sind Volumenzunahmen bei jedem Schritt. Solange sie unterhalb des tolerierbaren "Maximalvolumens" bleiben - für Rinderblastozysten für 30 Minuten bei +23°C das 2,7-fache ihres isotonischen Volumens - schadet diese Verdünnungsprozedur den Embryonen nicht (SCHNEIDER und MAZUR 1983; SCHNEIDER und MAZUR 1984).

Sucrose kann nicht in die Zellen eindringen (NIEMANN 1983) und verursacht als osmotische Gegenkraft eine eingeschränkte Wasserbewegung durch die Membranen. Ist Sucrose in isomolaler Konzentration (1,12 M Sucrose $\approx$ 1,71 osm und ist zu 1,5 M Glycerin isomolal) vorhanden, schwillt der Embryo nicht an, sondern schrumpft in dem Maß, in dem das Gefrierschutzmittel aus dem Embryo diffundiert (Abb. 2). Das Glycerin verläßt bei einer Verdünnung mit Sucrose den Embryo sehr viel schneller, als es ursprünglich eindrang. Dies deshalb, weil der intra-/extrazelluläre Konzentrationsgradient von Glycerin während der Verdünnung höher bleibt, da der extrazelluläre Raum groß genug ist, die extrazelluläre Glyzerinkonzentration niedrig zu halten. Je niedriger die Sucrosekonzentration, desto langsamer verläßt das Glycerin die Zellen. Wenn die Osmolalität der Sucrose/PBS-Lösung niedriger ist, als die der ursprünglichen intrazellulären Osmolalität des mit Glycerin äquilibrierten Embryos, schwillt dieser zunächst vorübergehend über sein isotonisches Volumen hinaus an. Solange dies unter dem 2,7-fachen des isotonischen Volumens bleibt, sind

jedoch bisher keine nachteiligen Auswirkungen bekannt geworden, da die Membran mit Mikrovilli bedeckt ist, die als zusätzliche Membranoberfläche während des Anschwellens dienen (SCHNEIDER und MAZUR 1984.)



nach SCHNEIDER und MAZUR 1984

Abb. 2: Anhand eines Permeabilitätskoeffizienten $P = 2,2 \times 10^{-3}$ cm/min computererrechnete Volumenveränderungen von Rinderblastozysten (Tag 7) bei Ausverdünnung von 1,5 M Glyzerin in einem Schritt oder mittels sinkendem Glyzeringradienten in 6 Schritten und einer Temperatur von +23°C

Die herkömmliche schrittweise Ausverdünnung erfolgt in 3 bis 6 Stufen durch Umsetzen der Embryonen nach jeweils 10 Minuten in PBS mit sinkenden Gefrierschutzmittelgradienten (WARE und BOLAND 1987; WILLADSEN et al. 1974; TERVIT und GOOLD 1984).

WARE und BOLAND (1987) verwendeten unterschiedliche Sucrosekonzentrationen von 0,25, 1,0 und 2,0 M, TERVIT und GOOLD (1984) benutzten eine 0,5 M und SCHIEWE et al. (1985) eine 0,75 M Sucroslösung zum Ausverdünnen des Gefrierschutzmittels.

2.10.4. Kulturergebnisse nach Auftauen der Embryonen

WARE und BOLAND (1987) untersuchten zwei unterschiedliche Tiefgefrierarten, d.h. sie kühlten Embryonen im Stadium von kompakter Morula bis expandierter Blastozyste entweder mit 1°C pro Minute von +20° bis +7°C ab oder gaben die Embryonen direkt in eine Umgebungstemperatur von -7°C.

Die Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff lag immer bei -30°C, das Auftauen erfolgte im Wasserbad mit +37°C. Als Gefrierschutzmittel wurde Glycerin in unterschiedlichen Endkonzentrationen (1,0/1,4/2,0/2,8 M) verwendet. Zum Ausverdünnen von Glycerin wurde entweder ein sinkender Glyzeringradient in 6 Schritten oder Sucrose mit ebenfalls unterschiedlichen Konzentrationen (0,25/1,0/2,0 M) herangezogen. Die Kultivierung erfolgte in PBS + 15 % hitzeinaktiviertem Schafserum. Als überlebend wurden Embryonen beurteilt, die sich bis zur expandierten oder geschlüpften Blastozyste weiterentwickelt hatten. Beim Vergleich der beiden, vor dem Seeding unterschiedlichen, Kühlraten konnte kein Unterschied im Überleben der Embryonen festgestellt werden.

Ohne Sucrose resultierten niedrige Glycerinwerte (1,0 und 1,4 M) in höheren Überlebensraten (58 und 67 %) als hohe Glycerinwerte (2,0 und 2,8 M; 15 bzw. 0 %). Eine 0,25 oder 2,0 M Sucroslösung verbesserte die Überlebensrate (9, 23 oder 17 %) nicht. Bei 1,0 M Sucrose und 1,0 M Glycerin überlebten 7 % der Embryonen gegenüber

58 % ohne Sucrose. Bei 1,0 M Sucrose und 1,4 M Glycerin entwickelten sich 75 % der Embryonen bzw. 67 % ohne Sucrose weiter. Der Zusatz von 2,0 M Glycerin, ausverdünnt mit 1,0 M Sucrose führte zu einer Entwicklungsrate von 80 %, wogegen diese Rate ohne Sucrose oder mit 2,0 M Sucrose bei 15 bzw. 17 % lag. Eine Konzentration von 2,8 M Glycerin im Gefriermedium führte ohne bzw. mit 1 M Sucrose zu einer Überlebensrate von 15 % (Tab. 5).

Auch MERRY et al. (1984) benutzten zwei unterschiedliche Kühlraten, konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Weiterentwicklung der Embryonen nach Auftauen und Kultivierung feststellen. Als Gefrierschutzmittel diente 1,4 M Glycerin. Die Zugabe erfolgte in 3 Schritten, die Ausverdünnung in 6 Schritten mit sinkendem Glyzeringradienten oder mit 0,25 M Sucrose. Die Kultivierung der kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten fand in Mikrotropfen modifizierter synthetischer Oviduktflüssigkeit (SOF) mit 10 % Lammserum unter Paraffinöl bei +37°C in 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft statt. Nach Ausverdünnung mittels Glyzeringradienten entwickelten sich 16 von 26 (61,54 %), nach Ausverdünnung mit 0,25 M Sucrose 4 von 30 (13,33 %) der Embryonen zur expandierten oder geschlüpften Blastozyste (Tab. 4).

SCHIEWE et al. (1985) verwendeten zwei unterschiedliche Gefrierschutzmittel - Glycerin oder Propylenglykol - in PBS mit einer Endkonzentration von 1,5 M. Die Zugabe erfolgte in 2 Schritten, die Ausverdünnung mit 0,75 M Sucrose in mPBS. Das Umsetzen in flüssigen Stickstoff erfolgte bei verschiedenen Temperaturen (-15°/-20°/-25°/-30° oder -35°C), das Auftauen immer im Wasserbad bei +37°C. Anschließend wurden Morulae und beginnende Blastozysten für 24 Stunden in Whitten's Medium + 0,15 % BSA kultiviert

und mittels Fluoreszin-Diazetat auf ihre Vitalität überprüft. Hierbei zeigten sich Schäden in der Zona pellucida bei 4 % der mit Propylenglykol und bei 40 % der mit Glycerin eingefrorenen Embryonen. Von 20 Embryonen, die bei -35°C oder -30°C in flüssigen Stickstoff umgesetzt worden waren, überlebten 19; von 30, bei -25° , -20° oder -15°C umgesetzten Embryonen überlebten 18. 19 bzw. 18 Embryonen, die in Gruppen von je 25 mit Propylenglykol bzw. Glycerin tiefgefroren worden waren überlebten. Zwischen den Gefrierschutzmitteln Propylenglykol bzw. Glycerin ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der Überlebensrate (Tab. 5).

2.10.5. Transferergebnisse nach Auftauen der Embryonen

WILLADSEN et al. (1974) konnten von 54, an Tag 5-8 gewonnenen Embryonen, nach Tiefgefrierkonservierung mit 1,5 M DMSO in PBS noch 36 auf Kaninchen übertragen und 35 nach 1-2 Tagen dort wieder ausspülen. Davon wurden 9 Embryonen auf 7 Schafe übertragen. 5 Schafe wurden nach Erstellung des Progesteronwertes als trächtig diagnostiziert. Die Umsetztemperaturen in flüssigen Stickstoff lagen zwischen -65° und -90°C , das Auftauen erfolgte mit $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Das DMSO wurde in 5 Schritten und sinkender DMSO-Konzentration ausverdünnt (Tab. 3).

BILTON und MOORE (1976) verwendeten ebenfalls 1,5 M DMSO in PBS, allerdings mit 25 % Schafserum, als Tiefgefriermedium. Sie untersuchten den Einfluß der Seedingtemperatur auf die Embryonen und führten ein Seeding ihrer Proben bei $-2,5^{\circ}$, -5° , $-7,5^{\circ}$ oder -10°C . Nach Seeding bei -10°C überlebte kein Embryo. Zwischen den übrigen Seedingtemperaturen war kein Unterschied in der Überlebensrate zu erkennen. Bei $-2,5^{\circ}\text{C}$ überlebten 8 von 22,

bei -5°C 16 von 31 und bei $-7,5^{\circ}\text{C}$ 8 von 24 Embryonen. In einem weiteren Experiment mit unterschiedlichen Auftauraten nach Seeding bei $-2,5^{\circ}\text{C}$ entwickelten sich von 51 tiefgefrorenen Morulae und beginnenden Blastozysten in Kultur 19 weiter. Davon wurden 7 auf Schafe übertragen und 3 Lämmer geboren (Tab. 3).

Auch WILLADSEN et al. (1976) benutzten 1,5 M DMSO als Gefrierschutzmittel, aber in mPBS + 3mg/ml BSA. Zugabe und Ausverdünnung von DMSO erfolgten jeweils in 0,25 M Schritten. Die Umsetztemperatur in Stickstoff lag bei -125° oder -130°C . Das Auftauen wurde mit Raten zwischen 3° und 360°C pro Minute durchgeführt. Von für 1-2 Tage auf Kaninchenovidukte übertragenen Embryonen wurden 11 auf 7 Schafe übertragen und 5 Lämmer geboren. Aus einem Transfer von 8 ohne Zona pellucida tiefgefrorenen Embryonen auf 4 Schafe wurden 3 Lämmer geboren (Tab. 3)

1977 übertrugen WILLADSEN et al. 24 Morulae paarweise auf 12 Schafe und erhielten 8 Lämmer. DMSO, in einer Endkonzentration von 1,5 M in mPBS + 3 mg/ml BSA, diente nach schrittweiser Zugabe als Gefrierschutz. Die Ausverdünnung nach dem Auftauen erfolgte mittels eines sinkenden DMSO-Gradienten. Die Proben waren bei -120°C in Stickstoff überführt worden. Die Auftaurate betrug $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Tab. 4).

SMORAG et al. (1982) froren u.a. 39 Morulae und beginnenden Blastozysten mit 1,5 M DMSO in mPBS ein. Die Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff lag bei -80°C , das Auftauen erfolgte mit 12° bis $14^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Sie konnten nach Auftauen und Ausverdünnung 23 Embryonen auf 14 Schafe übertragen. 7 Lämmer wurden geboren. Nach Übertragung von tiefgefrorenen 8-16 Zellern wurde kein Lamm geboren (Tab. 4).

TERVIT und GOOLD (1984) untersuchten 3 Gefrierschutzmittel, und zwar 1,4 M Glyzerin, 1,5 M DMSO oder 1,5 M Äthylenglykol in PBS. Die Zugabe von Glyzerin erfolgte dabei in zwei, die der beiden anderen Gefrierschutzmittel in drei Schritten. Die Ausverdünnung wurde in 4 Schritten mit sinkendem Gefrierschutzmitteldgradienten oder in 3 Schritten mit 0,5 M Sucrose (1. Gefrierschutzmittel + PBS + 0,5 M Sucrose; 2. PBS + 0,5 M Sucrose; 3. PBS) durchgeführt. Die Umsetztemperatur in flüssigen Stickstoff lag bei -38°C , das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei $+37^{\circ}\text{C}$. Von 166 tiefgefrorenen kompaktierten Morulae und Blastozysten wurden 159 wiedergefunden und 152 davon in einer Anzahl von 1-3 Embryonen pro Rezipient auf insgesamt 76 Schafe übertragen. Bei DMSO wurden aus jeweils 26 übertragenen Embryonen nach Sucroseausverdünnung 15 (58 %), nach herkömmlicher Ausverdünnung 11 (42 %) Lämmer geboren. Aus 24 bzw. 25, mit Äthylenglykol tiefgefrorenen Embryonen erhielten sie nach Ausverdünnung mittels sinkendem Äthylenglykolgradienten 12 (50 %) und nach Ausverdünnung mit Sucrose 16 (64 %) Lämmer. Nach Tiefgefrierkonservierung mit Glyzerin wurden aus 25, durch sinkenden Glyzeringradienten ausverdünnnten Embryonen 7 Lämmer (28 %) und aus 26, mit Sucrose ausverdünnnten Embryonen 11 Lämmer (42 %) geboren (Tab. 5).

SACHER et al. (1986) übertrugen aufgetaute Moorschnuckenembryonen auf 6 Schwarzkopfschafe und erzielten 3 Trächtigkeiten.

Tab. 3: Tiefgefrierkonservierung von Schafembryonen

	WILLADSEN et al. (1974)	BILTON und MOORE (1976)	WILLADSEN et al. (1976)
Anzahl/Alter der Embryonen	54 Embryonen Tag 5-8	77 bzw. 51 Morulae und junge Blastozysten, Tag 6	52 Embryonen Tag 1-8 nach dem Deckakt
Medium	PBS	PBS + 25 % Schaf- serum	mPBS + 3 mg/ml BSA
Gefrier- schutzmittel Endkonzentration und Zugabeart	1,5 M DMSO bei Raumtemperatur 0,25 M-Schritte mit je 5 Minuten Äquilibrierung	1,5 M DMSO Zugabe bei +30°C über 20 Minuten hinweg	1,5 M DMSO bei Raumtemperatur 0,25 M-Schritte mit je 5 Minuten Äquilibrierung
Behälter	Röhrchen, 0,2 ml	-	Röhrchen, 0,2 ml
Tiefgefrier- technik (= TG)	1. von +20°C bis 0°C in 10-20 min, 2. Embryonen in -6°C, 3. Seeding, 4. mit 0,3°C/min auf -65 bis -90°C	von +30°C bis 0°C mit 0,7°C/min Seeding bei: -2,5°C oder bei -5°C oder bei -7,5°C oder bei -10°C	1. 5-10 min bei 0°C, 2. Embryonen in -6°C bis -7°C, 3. 2 min später Seeding, 4. mit 0,3°C/min auf -65° und -70°C oder auf -125 und -130°C
Auftau- technik	12°C/min	-	3°/12°/360°C/min gleich nach Auftau- en Erwärmung auf Raumtemperatur
Gefrier- schutzmittel- ausverdünnung	bei Raumtemperatur 0,25 M-Schritte à 10 Minuten	-	bei Raumtemperatur 0,25 M-Schritte à 10 Minuten
Kultur- bzw. Transfer- ergebnisse	nach Tiefgefrieren 51 Embryonen gefun- den, 36 auf Kanin- chen übertragen, 35 nach 1-2 Tagen wiedergefunden, 9 Embryonen auf 7 Schafe übertragen, 5 trächtig, 9 Em- bryonen direkt auf 4 Schafe übertra- gen, 2 trächtig	bei Kultur von 77 Embryonen 8 v. 22, 16 v. 31, 8 v. 24 weiterentwickelt, keiner wenn Seeding bei -10°C; nach Tiefgefrieren von 51 Embryonen in Kultur 19 weiter- entwickelt, davon 7 Embryonen über- tragen, 3 Lämmer	Embryonen 1-2 Tage auf Kaninchenovi- dukt übertragen, davon 11 auf 7 Schafe übertragen und 5 Lämmer gebo- ren; 10 Embryonen ohne Zona pelluci- da tiefgefroren, 8 wiedergefunden und auf 4 Schafe über- tragen, 3 Lämmer

Tab. 4: Tiefgefrierkonservierung von Schafembryonen

	WILLADSEN et al. (1977)	SMORAG et al. (1982)	MERRY et al. (1984)
Anzahl/Alter der Embryonen	24 Morulae Tag 6 nach Östrusbeginn	8 8-16 Zeller; 39 Morulae und junge Blastozysten	28 Morulae/junge Blastozysten Tag 5
Medium	mPBS + 3 mg/ml BSA	mPBS	mPBS
Gefrier- schutzmittel Endkonzen- tration und Zugabeart	1,5 M DMSO bei Raumtemperatur 0,25 M für 5 min 0,5 M für 5 min 1,0 M für 10 min 1,5 M für 20 min	1,5 M DMSO	1,4 M Glyzerin 0,47 M für 10 min 0,93 M für 10 min 1,4 M für 30 min
Behälter	Röhrchen, 0,5x5 cm	-	Paillette, 0,5 ml
Tiefgefrier- technik (= TG)	1. +20°C bis -7°C mit 1°C/min, 2. Seeding bei -7°C, 3. mit 0,3°C/min auf -65° und mit 0,1°C/min auf -120°C	mit 0,27°C/min auf -80°C, dann in flüssigen Stickstoff	1. + 20°C bis -7°C mit 1°C/min, 2. 2 min halten und Seeding, 3. mit 0,3°C/min auf -60°C
Auftau- technik	10°C/min	12° bis 14°C/min	1. von -196°C in -100°C, 2. mit 10°C/min auf -10°C 3. 1 min in +37°C 4. 2 min bei Raum- temperatur
Gefrier- schutzmittel- ausverdünnung	0,25 M Schritte je 10 min, 20 min in PBS	-	bei Raumtemperatur 0,25 M Sucrose/mPBS oder je für 10 min 1,17/0,93/0,7/0,47/ 0,23 M Glyzerin, 2 mal mPBS
Kultur- bzw. Transfer- ergebnisse	Transfer von 24 Embryonen auf 12 Schafe à 2 Stück, 8 Lämmer	23 Embryonen auf 14 Schafe über- tragen, 7 Lämmer geboren; kein Lamm aus den übertragenen 8-16 Zellern	15 Embryonen Sucro- seausverdünnung und kultiviert, 1 Em- bryo zur geschlüpf- ten Blastozyste, 13 Embryonen herkömm- lich ausverdünn, 6 zur expandierten / 2 zur geschlüpften Blastozyste

Tab. 5: Tiefgefrierkonservierung von Schafembryonen

	TERVIT und GOOLD (1984)	SCHIEWE et al. (1985)	WARE und BOLAND (1987)
Anzahl/Alter der Embryonen	166 späte Morulae und Blastozysten	50 späte Morulae/ junge Blastozysten	kompaktierte Moru- lae/expandierte Blastozysten
Medium	PBS	mPBS	mPBS + 15 % Schaf- serum
Gefrier- schutzmittel Endkonzen- tration und Zugabeart	bei Raumtemperatur DMSO/Äthylenglykol 0,5 u. 1 M für je 20 min; 1,5 M für 20 min + 20 min in Ampulle; Glycerin 0,7 u. 1,4 M für je 10 min + 10 min in Ampulle	1,5 M Glycerin oder Propylenglykol = PPG bei Raumtempe- ratur (+21°C) je 10 min in 0,75 und 1,5 M	1,0/1,4/2,0/2,8 M Glycerin in 3 Schritten à 10 min 33/67/100 % der Endkonzentration
Behälter	Glasampulle 0,6 ml	Ampullen	Paillette, 0,5 ml je 1-6 Embryonen
Tiefgefrier- technik (= TG)	1. +20°C bis -7°C mit 1°C/min, 2. Seeding bei -7°C, 3. mit 0,3°C/min auf -35°C und mit 0,1°C/min auf -38°C	1. +20°C bis -5°C mit 1°C/min, 2. Seeding, 3. mit 0,3°C/min bis -15°/-20°/-25°/ -30° oder -35°C 4. in Stickstoff	a: +20°C bis -7°C mit 1°C/min; See- ding; mit 0,3°C pro min bis -30°C b: 1 min in -7°C; mit 0,25°/0,3°C pro min bis -30°C
Auftau- technik	+37°C Wasserbad bis zum Schmelzen des Eises	+37°C Wasserbad	+37°C Wasserbad für 1 min
Gefrier- schutzmittel- ausverdünnung	a: je 10 min 1:6 2:6 3:3 b: Gefrierschutz + PBS + 0,5 M Sucrose für 10 min; nur PBS	0,75 M Sucrose in mPBS	0,25/1,0/2,0/ M Sucrose oder 85/65/50/35/18/0 % Glycerin
Kultur- bzw. Transfer- ergebnisse	DMSO: LÄ = Lämmer a: 11 LÄ v. 26/26 b: 15 LÄ v. 26/28 Äthylenglykol: a: 12 LÄ v. 24/29 b: 16 LÄ v. 25/25 Glycerin: a: 7 LÄ v. 25/31 b: 11 LÄ v. 26/27 Transfers/TG	Kultur in Whitten's Medium + 0,15 % BSA, n. 24 Std. Überle- bensrate mit Fluo- reszenztest: Glycerin 18 v. 25 PPG 19 v. 25 -35°/-30°C 19 v. 20 -15°/-20°/-25°C 18 v. 30	Kultur in mPBS + 15 % Schafserum, expandierte bzw. geschlüpfte Blastozysten bei schrittweiser Aus- verdünnung 0 bis 58 % und bei Sucrose 9 bis 80 %

3. TIERE UND METHODE

3.1. Haltung und Fütterung

Als Embryonenspender wurden 38 Berg- und 30 Merinolandschafe im Alter von 9 Monaten bis 4 Jahren verwendet. Sie wurden in Gruppen von jeweils ca. 20 Tieren in einem Freilaufstall mit Stroheinstreu von ca. 50 m² mit einem Auslauf von ca. 100 m² gehalten.

Die zum Decken benutzten Merino/Schwarzkopf- und Merino/-Bergschafböcke hatten ein Alter zwischen 9 Monaten und 3 Jahren. Alle Böcke waren nachgewiesenermaßen fertil. Zusätzlich wurde regelmäßig ihre Spermabeschaffenheit kontrolliert.

Kraftfutter und Heu wurden zweimal pro Tag gefüttert, Wasser und Minerallecksteine standen ad libitum zur Verfügung. Alle Tiere wurden zweimal pro Jahr entwurmt und im Abstand von 4-6 Wochen einem Klauenbad unterzogen.

Die Untersuchungen fanden in einem Zeitraum von ca. 18 Monaten statt.

3.2. Zyklussynchronisation und Superovulation der Spendertiere

Die Zyklussynchronisation erfolgte mit Chrono-Gest^R-Schwämmen (Intervet, Frankreich), die 40 mg Fluorogestonacetat (FGA) enthielten und 14 Tage intravaginal verblieben.

Um eine Superovulation auszulösen, wurden, 36 Stunden vor

Schwammentnahme beginnend, insgesamt 18 mg FSH (Burns-Biotec, USA) verabreicht. Sechs intramuskuläre Injektionen wurden in zwölfstündigem Abstand und abnehmender Dosis, d.h. je zweimal 4/3/2 mg, gegeben.

36 Stunden nach Schwammentnahme kam jeweils ein weibliches Schaf für ca. 6 Stunden zu einem Bock. Die Belegung wurde beobachtet. Der Tag der Bedeckung ($\equiv$ Östrus) wurde als Tag 0 gewertet.

3.3. Vorbereitung der Empfängertiere

Als Empfängertiere wurden 15 nullipare Merinolandschafe und 4 Merino/Schwarzkopfmischlinge im Alter von 9-18 Monaten herangezogen.

Die Synchronisation erfolgte wie bei den Spendern (3.2.), jedoch wurde nur bei Entnahme des Schwammes eine einmalige intramuskuläre Injektion von 750 I.E. PMSG (Seragon^R, Ferring) gegeben.

3.4. Embryogewinnung

Die Embryogewinnung fand am 5. und 6. Tag nach Bedeckung (Tag 0 $\equiv$ Bedeckung) statt. Die Tiere wurden maximal zweimal zur Embryogewinnung herangezogen, wobei die erste Spülung chirurgisch oder nach Schlachtung erfolgte, die zweite immer nach Schlachtung.

Am 5. Tag der Trächtigkeit wurden 32 Spülungen durchgeführt, 14 bei Berg- und 18 bei Merinolandschafen.

Von den 14 Spülungen der Bergschafe fanden 10 nach Laparotomie und erstmaliger Superovulation sowie 4 nach einer zweiten Superovulation und Schlachtung statt. Alle 18 Spülungen der Merinolandschafe erfolgten nach erstmaliger Superovulation und Schlachtung der Tiere.

Am 6. Tag der Gravidität wurden insgesamt 56 Spülungen, 44 bei Berg- und 12 bei Merinolandschafen, ausgeführt. Hierbei wurden die Bergschafe 19 mal nach Laparotomie und 1. Superovulation, 9 mal nach Schlachtung und 1. Superovulation sowie 16 mal nach Schlachtung und 2. Superovulation gespült. Die 12 Spülungen der Merinolandschafe erfolgten alle nach Schlachtung und 1. Superovulation.

Bei Laparotomie fand eine antegrade Spültechnik mit Ballonkatheter nach TERVIT und HAVIK (1976) Verwendung, bei exstirpiertem Uterus eine retrograde Spülmethode nach ROWSON et al. (1969).

Als Spülmedium (3.5.3.) diente modifizierte "phosphatgepufferte Salzlösung" (mPBS) nach WHITTINGHAM (1971) mit 2 % fetalem Kälberserum (FCS). Für die Spülung wurde das Medium auf eine Temperatur von +37°C vorgewärmt.

3.4.1. Embryogewinnung nach Laparotomie

Jeweils 24 Stunden vor der Operation wurden die Schafe ausgeüchtert. Die Prämedikation erfolgte 30 Minuten vor Operationsbeginn mit einer intramuskulären Injektion von 2 ml Combelen^R (Bayer, Leverkusen) und 15 Minuten später mit der subkutanen Verabreichung von 10 mg Atropinsulfat (Atropinum sulfuricum solutium 1 %^R; WDT, Hannover). Wiederum 15 Minuten danach wurden, je nach Reaktion des Schafes, 800-1000 mg Thiogenal^R (Merck, Darmstadt)

intravenös gegeben. Die Intubation erfolgte nach Erlöschen von Lid- und Zwischenklauenreflex sowie bei weitgestellten Pupillen mit einem Tubus Nr. 8 oder 8,5 (Rüsch, Waiblingen), je nach Größe des Schafes.

Die Anästhesie wurde mit einem Halothan/Sauerstoffgemisch durchgeführt. Für die Operation waren die Schafe auf dem Rücken, in einem Winkel von 45° mit dem Kopf nach unten, gelagert. Nach Rasur, Entfetten mit Alkohol, Desinfektion und Besprühen mit Leukospray^R (Nr. 9190; Beiersdorf AG, Hamburg) wurde das Operationsfeld mit einem Veterinärabdecktuch (Buster steril, 90 x 120 cm; Fa. Stinglwagner, Eching) bedeckt, anschließend ein 10-15 cm langer Schnitt in der Linea alba, so nah wie möglich am Euter beginnend, gesetzt, der Uterus vollständig vorgelagert und Corpora lutea sowie Follikel gezählt.

Möglichst nah am Uteruskörper wurde die Wand eines Uterushornes mit einer Mosquitoklemme durchstoßen und ein Ballonkatheter (CH 12; Rüsch, Waiblingen) 3-4 cm nach kranial geschoben. Der Ballon wurde, entsprechend der Größe des Uterushornes, mit 3-5 ml Luft aufgeblasen. Ca. 2 cm kaudal des Übergangs von Uterushornspitze zum Eileiter wurde eine Braunüle 0-G 20 Luer (B. Braun Melsungen AG) in Richtung Eileiter eingeführt und mit einem Infusionsverlängerungsstück (Luer Lock, M.O.P.) verbunden, über das 50 ml Spülmedium mit einer Temperatur von +37°C in das Uterushorn eingebracht wurden. Um einen Rückfluß zu vermeiden, wurde der Eileiter am Übergang zur Uterushornspitze durch Zusammenpressen zwischen zwei Fingern verschlossen. Der Abfluß des Spülmediums erfolgte über den Ballonkatheter in eine 100 ml fassende, silikonisierte Glasflasche. Mit dem anderen Uterushorn wurde

ebenso verfahren (Abb. 3).

Die durch Mosquitoklemme bzw. Schlauch und Braunüle verursachten Wunden am Uterus wurden nicht vernäht. Um das Abdomen zu verschließen, wurden zunächst Peritoneum und Muskelschicht zusammen, anschließend die Unterhaut mit fortlaufender Kürschnernaht genäht. Die Hautnaht erfolgte mit einzelnen U-Heften. Für die beiden ersten Nähte wurde Catgut 6/0 (Lyofil; Pfrimmer-Viggo, Erlangen) benutzt, für die Hautnaht Syntofil 4/1 (Vitalon; Howmedica, Hamburg).

Jedes Schaf erhielt darüberhinaus 4 ml Tetanusserum (WDT, Hoyerhagen) subkutan und 7 ml Bayrena^R (Bayer, Leverkusen) intravenös und 1,5 ml Iliren^R (Hoechst, München) subkutan, um eine Luteolyse auszulösen und so eine Trächtigkeit durch eventuell nicht ausgespülte Embryonen zu vermeiden. 8 Tage nach der Operation wurden die Fäden gezogen.

3.4.2. Embryogewinnung am exstirpierten Uterus

Sofort nach der Schlachtung der Schafe am Städtischen Schlachthof München wurde der Uterus mit Ovarien entnommen und zum Transport zurück an die Klinik in +37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung in einem Dewarbehälter verwahrt.

Für die Spülung wurde zunächst eine gebogene Knopfkanüle A mit 1,2 mm Durchmesser ca. 2 cm kranial der Uterusbifurkation in das Lumen eines Uterushornes eingebracht, dann eine zweite gebogene Knopfkanüle B, ebenfalls mit 1,2 mm Durchmesser, durch den Fimbrientrichter in den Eileiter des selben Horns eingeführt und dieser mit 2 Fingern verschlossen. Die Uterushornbasis wurde zwischen 2 Fingern fest zusammengepreßt, über die Kanüle B 20 ml

Spülmedium mit $+37^{\circ}\text{C}$ in das Uterushorn verbracht, dann in Richtung Uterushornspitze gestreift und über die Kanüle A in einer 50 ml fassenden Kulturschale (Falcon 3003, 100 x 20 mm; Div. Becton, Dickinson & Co., USA) aufgefangen. Das 2. Horn wurde ebenso gespült (Abb. 4).

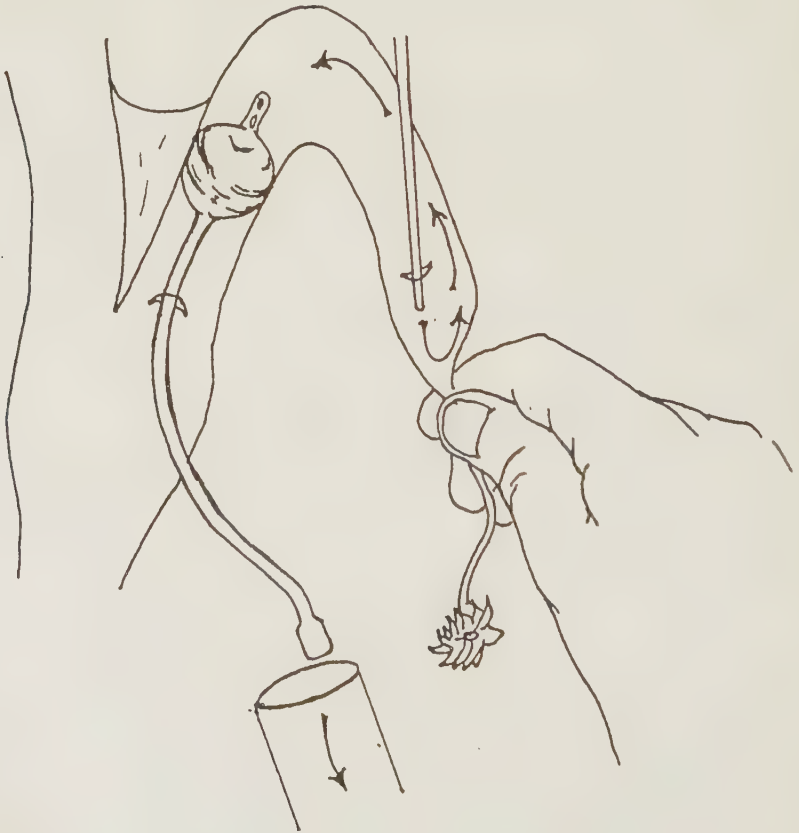


Abb. 3: Uterusspülung zur Embryogewinnung nach Laparotomie

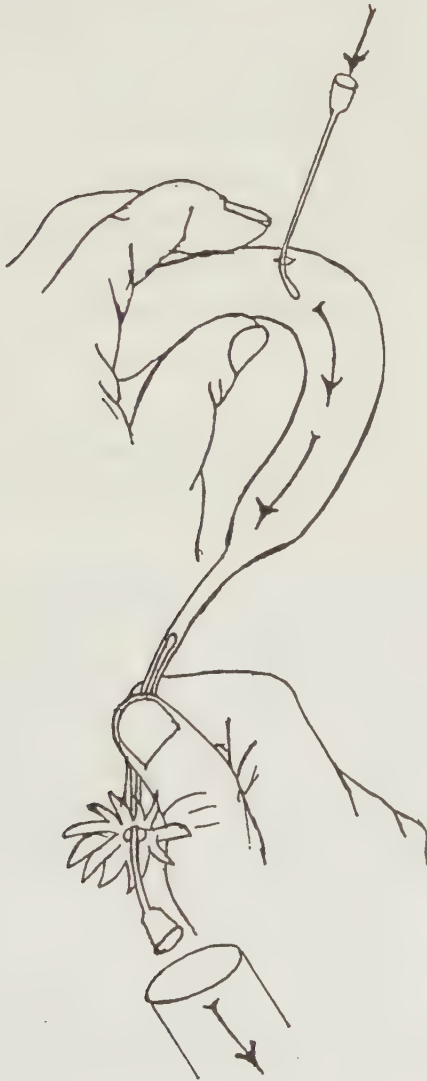


Abb. 4: Spülung des exstirpierten Uterus zur Embryogewinnung

3.5. Vorbereitung der Medien

Zum Spülen der Uteri wurde mPBS (modified Phosphate Buffered Saline; siehe Seite 48) mit 2 % FCS (Fetal Calf Serum; Hinweis auf Seite 47), zum Waschen der Embryonen und für deren kurzzeitige Aufbewahrung mPBS mit 20 % FCS verwendet.

Für die Tiefgefrierkonservierung wurde mPBS + 20 % FCS mit 1,4 M Glycerin bzw. 0,5 M Sucrose ergänzt.

Als Kulturmedien dienten mKRBL und HAMS F-10 mit 4 mg/ml BSA oder 10 % FCS.

3.5.1. Reinigung und Sterilisation der benötigten Geräte

Alle Gläser, Plastiksraubverschlüsse und Spatel sowie die zum Spülen der Uteri verwendeten Knopfkanülen und Ballonkatheter wurden nach ihrem Gebrauch zunächst mit Wasser und Bürste bzw. Schwamm grob gereinigt, anschließend für mindestens 24 Stunden in ein Desinfektionsbad (Laborreiniger 7X; Serva, Best.Nr.: 34205) gegeben, mit entionisiertem Wasser abgespült, bei +60°C für 12 Stunden getrocknet und dann in Alufolie verpackt. Vor erneuter Verwendung wurden Gläser oder Metallgegenstände für 2 Stunden bei 150°C trockener Hitze sterilisiert, Plastikverschlüsse und Ballonkatheter autoklaviert.

3.5.2. Vorbereitungsarbeiten

Alle fertiggestellten Medien wurden durch einen Einmalfilter mit 0,2 µ Porengröße (Schleicher + Schell, Selectron M, FPO27/3) filtriert.

Die 100 ml-Flaschen, in die bei Operationen Embryonen ge-

spült wurden, waren mit Silikonlösung (Serva, Best.Nr.: 35130) silikonisiert. Dies geschah, indem das Fläschchen zunächst bis zum Rand mit Silikonlösung gefüllt, dann ausgeleert und umgedreht stehend für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Anschließend erfolgte das "Einbrennen" bei +100°C für 60 Minuten.

Um "Medientropfen" für die Kultur der Embryonen herstellen zu können, wurde Silikonöl DC 200 (Serva, Best.Nr.: 35134) benutzt, das vor seinem jeweiligen Gebrauch für 2 Stunden in einen Trockenschrank bei +150°C verbracht und ansonsten im Brutschrank (Heraeus-Begasungs-Brutschrank Typ B 5060 Ek/CO₂; Heraeus GmbH, Hanau) bei +37°C und 5 % CO₂ in Luft aufbewahrt wurde.

Das fetale Kälberserum (FCS; Serva, Best.Nr.: 47900) wurde vor seiner Verwendung für 35 Minuten bei +56°C hitzeinaktiviert.

3.5.3. Spül-, Aufbewahrungs- und Tiefgefriermedien

Zur Herstellung einer "PBS-Stammlösung" (Tab. 6) wurden Puffersalze nach Dulbecco mit Ca und Mg (Serva, Heidelberg, Best.Nr.: 47300) verwendet. Der Inhalt zweier Röhrchen wurde, nach Gebrauchsanweisung, getrennt in jeweils 450 ml sterilem, bi-distilliertem, entionisiertem Wasser unter kräftigem Schütteln gelöst, anschließend beide Lösungen zusammengegossen und dann ad 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert betrug 7,2.

Die Stammlösung wurde, ohne Sterilfiltration, bis zu 4 Wochen bei +5°C aufbewahrt.

Zur Erstellung einer modifizierten PBS nach WHITTINGHAM (1971) wurden Glukose, Na-Pyruvat und Antibiotika zur Stammlösung gegeben (Tab. 7).

Tab. 6: Puffersalze nach Dulbecco mit Ca
und Mg (Serva, Heidelberg, Best.Nr.: 47300)

Röhrchen I: NaCl	8000 mg/l
KCl	200 mg/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	100 mg/l
CaCl ₂ (wasserfrei)	100 mg/l

Röhrchen II: Na ₂ HPO ₄	1000 mg/l
NaH ₂ PO ₄	150 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l

Tab. 7: Modifiziertes PBS (mPBS) nach WHITTINGHAM, 1971

in 1000 ml PBS-Stammlösung wurden gelöst:

1000 mg Glukose	(a-D(+)-Glukose; Sigma, G 6138)
36 mg Na-pyruvat	(Sigma, P 5280)
10 ml Antibiotic/Antimycotic Solution 100X	
	(Sigma, A 9909)

Das Ausspülen der Embryonen erfolgte mit mPBS + 2 % FCS,
d.h. zu 980 ml mPBS wurden 20 ml fetales Kälberserum gegeben.

Zum Waschen und kurzzeitigen Aufbewahren wurde mPBS + 20 %
FCS verwendet, d.h. 800 ml mPBS wurden 200 ml FCS zugesetzt.

Um eine 1,4 molare Glyzerinlösung zu erhalten, wurden
104,3 ml mPBS + 20 % FCS mit 12 ml Glyzerin (Serva, Best.Nr.:
23175) vermischt und als Tiefgefriermedium benutzt.

Die Ausverdünnung nach dem Auftauen erfolgte mit mPBS + 20 % FCS + 0,5 M Sucrose, d.h. es wurden 17,12 g Sucrose (Sigma, Best.Nr.: S 9378) abgewogen und mit mPBS + 20 % FCS ad 100 ml aufgefüllt.

Das Spülmedium wurde in 100 ml-Flaschen, das mPBS + 20 % FCS sowie das Tiefgefrier- und Auftaumedium in sterile, verschraubbare, 10 ml fassende Zentrifugenröhrchen (Falcon, Tube 2095) filtriert (siehe 3.4.2.) und bis zum Gebrauch bei -20°C tiefgefroren oder am Tag vor seiner Verwendung frisch hergestellt und über Nacht im Kühlschrank bei +5°C aufbewahrt

3.5.4. Kulturmedien

Die Stammlösung des mKRBL (modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung; Tab. 8) wurde jeweils zu 500 ml vorbereitet und ohne Sterilfiltration bis zu 8 Wochen bei +5°C aufbewahrt.

Am Tag vor Gebrauch wurden zur Herstellung von 100 ml gebrauchsfertigem Medium die in Tabelle 8 beschriebenen Substanzen zugegeben. Das fertige Medium wurde in sterile Plastikzentrifugenröhrchen filtriert (siehe 3.5.2. und 3.5.3.).

Um Tropfen unter Öl herzustellen, wurden zunächst je drei 200 µl-Tropfen Medium in eine Kulturschale (Falcon, 3002F, 60x15 mm; Div. Becton, Dickinson & Co., USA) pipettiert, etwas Siliconöl dazugegeben, nochmals drei 200 µl-Tropfen auf die ersten Tropfen pipettiert und schließlich soviel Siliconöl ergänzt, daß die Mediumtropfen gut bedeckt waren. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der Kulturschalen für ca. 12-20 Stunden vor Zugabe der Embryonen im Brutschrank bei +37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 5 % CO₂ in Luft.

Tab. 8: Modifizierte Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung
(mKRBL) nach TOYODA und CHANG, 1974

für 500 ml Stammlösung:

NaCl	2770 mg (Sigma, S 5886)
KCl	178 mg (Sigma, P 5405)
KH_2PO_4	81 mg (Sigma, P 5655)
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	147 mg (Merck, 5886)
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	126 mg (Sigma, C 7902)
in 40 ml warmem A. bidest. extra auflösen	
Phenolrot	1 mg (0,5 %ige Lsg. $\cong$ 200 μ l; Flow Laboratories, England 16-900-49)
entionisiertes, bidest. Wasser ad 500 ml	

für 100 ml gebrauchsfertiges Medium:

Na-Laktat (Syrup)	0,37 ml (Sigma, L 4265)
Na-Pyruvat	5,5 mg (Sigma, P 5280)
Glukose	100 mg (Sigma, G 6138)
Antibiotic/Anti- mycotic Sol. 100X	1,0 ml (Sigma, A 9909)
NaHCO_3	210 mg (Sigma, S 5761)
Stammlösung	ad 100 ml

pro 1 ml gebrauchsfertiges Medium 4 mg BSA
(Sigma, A 4378) oder pro 9 ml Medium 1 ml
hitzeinaktiviertes FCS

Als zweites Kulturmedium fand **HAMS F-10** (Serva, Best.Nr.: 47490) Verwendung. Es enthält im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Medien u.a. Vitamine und Aminosäuren. Das bereits fertige, portionsweise abgepackte Pulvermedium wurde zunächst in ca. 800 ml bidestilliertem, entionisiertem Wasser gelöst und dann auf genau 900 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde ohne Sterilfiltration in 100 ml-Flaschen à 90 ml eingefroren.

Einen Tag vor Gebrauch wurde eine Portion aufgetaut, 120 mg NaHCO_3 und 1 ml Antibiotic/Antimycotic Solution 100X hinzuge-

fügt und nach vollständigem Lösen mit Aqua bidest. ad 100 ml aufgefüllt. Das Medium wurde in Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert und entweder zu 10 ml HAMS F-10 40 mg BSA oder zu 9 ml 1 ml FCS gegeben.

Die Herstellung der Tropfen erfolgte wie oben bereits beschrieben.

3.6. Morphologische Bewertung der Embryonen

Sofort nach der Gewinnung wurden die Embryonen in kleine Kulturschalen (Falcon, 3001F, 35x10 mm; Div. Becton, Dickinson & Co., USA) mit ca. +22°C warmem mPBS + 20 % FCS umgesetzt. Dies erfolgte jeweils im Abstand von 5-10 Minuten noch zweimal, um sie zu waschen. Dabei fand auch die Beurteilung der Embryonen, d.h. ihre Klassifizierung in verschiedene Gruppen nach Kriterien von BRAUN (1977) und NIEMANN et al. (1982) statt.

Vier Klassen wurden gebildet, wobei Embryonen der Klassen A oder B als morphologisch intakt bewertet wurden.

Klasse A: Die Blastomerenzahl entsprach dem erwarteten Entwicklungsstand; alle Blastomeren waren gleichmäßig, die Zellmasse war nicht kollabiert und die Begrenzung klar differenziert.

Klasse B: Die Blastomerenzahl entsprach dem erwarteten Entwicklungsstand; einzelne Blastomeren waren aus dem Zellverband gelöst, die Zellmasse war leicht kollabiert, der Rand klar differenziert.

Klasse C: Deutlich verminderte Blastomerenzahl; die Blastomeren waren ungleichmäßig, hatten teilweise unscharfe Grenzen und

die Zellmasse war kollabiert.

Klasse D: Deutlich verminderte Blastomerenzahl; die Blastomeren waren ungleich groß und ohne scharfe Begrenzung, die Zellmasse kollabiert bei Auseinanderfallen des Zellverbandes.

3.7. Kultivierung der Embryonen

Nach dem bereits erwähnten Waschen wurden Embryonen der Klassen A bis C zur Kultivierung verwendet. Es handelte sich dabei um Morulae (Tag 5) sowie kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten (Tag 6; Tab. 9).

Pro Mediumtropfen wurden ca. 3-5 Embryonen eingesetzt. Die Kulturdauer betrug 48-72 Stunden. Alle 24 Stunden wurde der Entwicklungsstand beurteilt. Die Kultur erfolgte bei +37°C mit 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Luft.

Tab. 9: Verteilung von Morulae (Tag 5), kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten (Tag 6) in verschiedenen Kulturmedien

Kulturmedien	Tag 5 (n = 55) Klasseneinteilung			Tag 6 (n = 44) nach Morphologie			gesamt Tag 5/Tag 6	
	A	B	C	A	B	C		
HAMS F-10	BSA	9	-	-	3	3	3	9/ 9
	FCS	6	2	2	4	3	3	10/10
mKRBL	BSA	19	3	3	-	5	7	25/12
	FCS	5	5	1	7	4	2	11/13

3.8. Tiefgefrieren der Embryonen

3.8.1. Gefrierschutzmittelzugabe und Beschicken der Pailletten

Nach Waschen und Klassifizierung wurden 5 und 6 Tage alte Embryonen (Tag 0 $\hat{=}$ Tag der Bedeckung), d.h. Morulae, kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten der Klassen A und B eingefroren.

Zunächst wurden die Embryonen bei ca. +22°C direkt in mPBS + 20 % FCS mit 1,4 M Glycerin gegeben und anschließend 25 Minuten lang äquiliбриert.

Noch während der Äquiliбриierung erfolgte das Aufziehen der Embryonen in "Minipailletten" für ET (Fa. Albrecht, Aulendorf, Best.Nr.: ZA-029); zunächst eine Mediumsäule von 12 mm, um den Stopfen zu verschließen, dann 10 mm Luft, anschließend 20 mm Medium mit 1-3 Embryonen, wiederum 10 mm Luft und zuletzt 56 mm Medium mit 0,5 M Sucrose (Abb. 5). Der Verschluß des anderen Paillettenendes erfolgte mit "Sticks für Embryotransfer" (Fa. Albrecht, Aulendorf; Best.Nr.: ZA 144).

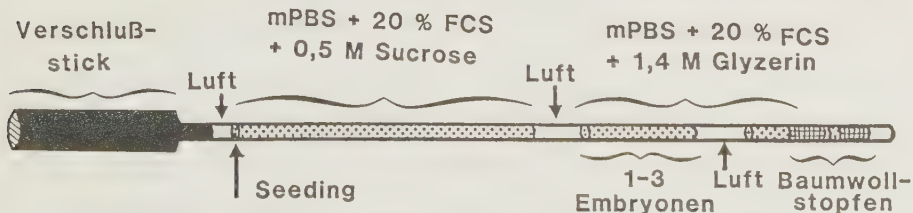


Abb. 5: Beschickung der Paillette

3.8.2. Geräteanordnung

Zur Tiefgefrierkonservierung wurde entweder ein Alkoholbad (4-6 Liter 96 %iger Äthylalkohol in einem Dewarbehälter) das mit Trockeneiswürfeln gekühlt wurde oder ein automatisches Tiefgefriergerät (Gefrierkammer R 202, Programmregler MR1/TC1; Messer, Griesheim, Krefeld), in das Stickstoffdampf geblasen wurde, benutzt.

Der Alkohol wurde durch ein Rührwerk (RW 20 DZM; Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen) ständig umgewälzt. Mit Hilfe eines, an einen Thermoschreiber (Varian, Darmstadt) angeschlossenen, Kupfer-Konstantan Meßfühlers erfolgte die Temperaturkontrolle. Dieser Meßfühler wurde in einer, entsprechend den anderen, mit Tiefgefriermedium gefüllten Kontrollpaillette platziert. Der Meßbereich des Thermoschreibers lag zwischen $+50^{\circ}$ und -200°C , die Laufgeschwindigkeit des Papiers wurde auf 1 cm pro Minute eingestellt. Die Pailletten wurden während des Tiefgefriervorgangs im Alkoholbad vertikal in einer Halterung gelagert, die aus 3 runden, in einem Abstand von 2,5 cm angeordneten, Plastikscheiben mit je 7 cm Durchmesser und 3 mm Dicke bestand. In die beiden oben gelegenen Plastikscheiben waren Löcher mit 4 mm Durchmesser eingestantzt (Abb. 6).

Die Temperatur in der Gefrierkammer des Einfriergerätes wurde mit 2 Meßfühlern (PT 100; Messer-Griesheim, Krefeld) mit ca. 3 mm Durchmesser kontrolliert. Eine Meßsonde war an den Programmregler angeschlossen, die andere an den Temperaturschreiber (Gila 1000; Messer-Griesheim, Krefeld). Die Laufgeschwindigkeit des Papiers wurde auf 1 cm in 2 Minuten eingestellt, der Meßbereich auf $+25^{\circ}$ bis -75°C .

Die Lagerung der Pailletten in der Gefrierkammer erfolgte ebenfalls vertikal, jedoch mit dem durch den Plastikstick verschlossenen Ende nach unten (Abb. 7).

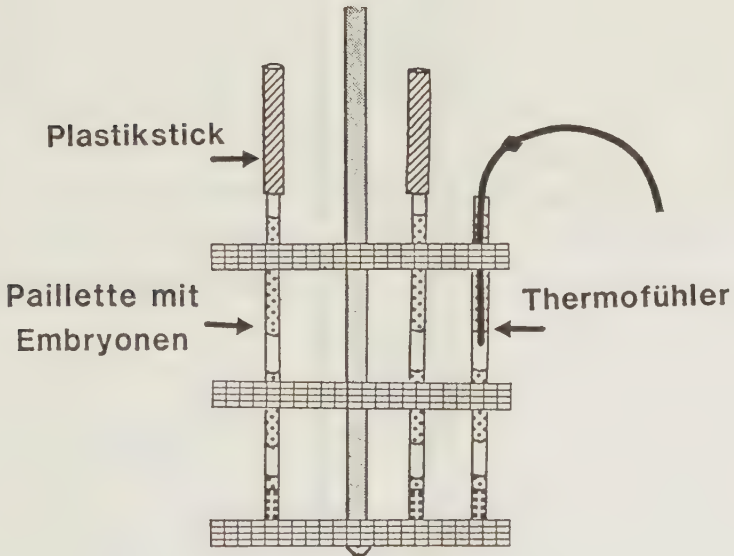


Abb. 6: Anordnung der Pailletten im Alkoholbad

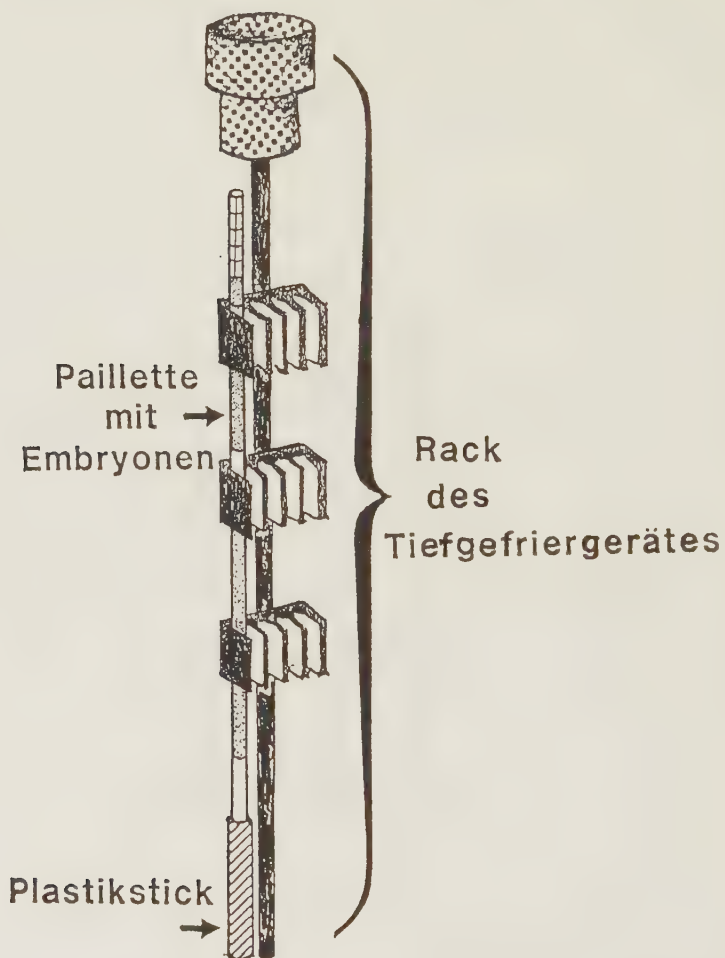


Abb. 7: Anordnung der Pailletten im Rack der Gefrierkammer

3.8.3. Tiefgefrierprotokoll

Als Einfrierprotokoll wurde ein One-Step-Verfahren in Anlehnung an SCHNEIDER und MÁZUR (1984) herangezogen:

- Nach Glyzerinzusatz und darauffolgender 25 minütiger Äquilibration bei +22°C wurden die in Pailletten abgefüllten Embryonen direkt in das auf -5°C vorgekühlte Tiefgefriergerät bzw. in das auf -5°C vorgekühlte Alkoholbad gegeben. Es schlossen sich nochmals 5 Minuten Äquilibration bei gleichbleibender Temperatur an.
- Es folgte das Seeding mit einer in Flüssigstickstoff vorgekühlten Pinzette und wieder 10 Minuten Äquilibration, ebenfalls bei -5°C.
- Dann wurde mit 0,3°C/min auf -32°C gekühlt, nochmals 25 Minuten äquilibriert, also die Temperatur bei diesen -32°C gehalten und die Pailletten schließlich direkt in LN₂ verbracht.

3.9. Auftauen der Embryonen

Das Auftauen der Embryonen erfolgte nach zweiwöchiger bis achtmonatiger Lagerung der Pailletten in Flüssigstickstoff:

- Zunächst wurde die Paillette für ca. 12 Sekunden, d.h. bis zum Auftauen des Inhalts, in ein Wasserbad von +32°C gegeben.
- Sofort danach erfolgte das Ausschlagen der Paillette wie bei einem Thermometer. Anschließend blieb die Paillette 20 Minuten bei +22°C stehen, wobei sie nach den ersten 10 Minuten um 180° gedreht worden war.
- Nach der zwanzigminütigen Äquilibration wurden die Embryonen in

mPBS +20 % FCS gegeben und 5 Minuten später beurteilt, noch zweimal gewaschen (je 10 Minuten) und dann endgültig klassifiziert.

Für einen Transfer wurden nur Embryonen verwendet, die nach Tiefgefrierkonservierung noch in Klasse A bzw. B einzustufen waren, zum Kultivieren wurden Embryonen der Klassen A, B und C herangezogen.

3.10. Kultur der aufgetauten Embryonen

Als Kulturmedium wurde mKRBL mit 10 % FCS verwendet. Die Kulturdauer betrug 48-72 Stunden bei +37°C mit 5 % CO₂ bei waserdampfgesättigter Luft in Mediumtropfen unter Silikonöl, wie bereits in 3.6.2. beschrieben.

3.11. Transfer der aufgetauten Embryonen

Die Vorbereitung der Empfängertiere wurde bereits in 3.3. besprochen. Sie erfolgte entsprechend dem Gewinnungstag der Embryonen, d.h. die Empfängerschaften wurden ebenfalls auf Tag 5 bzw. Tag 6 synchronisiert.

Als Transfermedium diente mPBS mit 20 % FCS, auf ca. +22°C erwärmt. Zwei unterschiedliche Transfermethoden fanden Verwendung.

Bei der 1. Methode wurden die Embryonen nochmals in ET-Pailletten aufgezogen, ebenso wie beim Tiefgefrieren, und in ein Transfergerät (Transferkanüle, Modell Hannover; Fa. Wörrlein,

Ansbach) eingelegt. Die Laparotomie erfolgte wie in 3.4.1. beschrieben, aber nach Vorverlagerung des Uterus und nach Zählen der Corpora lutea wurde zunächst mit einer Mosquitoklemme die Wand eines Uterushorns ca. 5-6 cm kaudal der Uterushornspitze durchstoßen, anschließend mit dem Transfergerät eingegangen, dieses schließlich 3-4 cm weit in Richtung Hornspitze geschoben und die Paillette entleert.

Für die 2. Transfermethode wurden zunächst 1-2 Embryonen mittels eines Mikropipettierhelfers (Brand-Mikropipettierhelfer) in Einmal-Mikropipetten (Blaubrand^R intra Mark^R, 10 + 50 µl ± 1 %; Best.Nr.: 708735) aufgezogen, die vorher auf einen Durchmesser von ca. 200 µ ausgezogen worden waren. Nach Laparotomie und Vorverlagerung des Uterus wurde dann eine Braunüle 0-G 20 Luer (B. Braun Melsungen AG) 5-6 cm kaudal der Uterushornspitze 3-4 cm weit eingebracht, der Mandrin entfernt, die Pipette durch die Braunüle eingeführt und entleert;

Pro Schaf wurden 2-4 Embryonen übertragen. Von Tag 5 wurden 11 Embryonen auf 4 Schafe übertragen, alle mit Methode 1. Von Tag 6 wurden 47 Embryonen (20 kompaktierte Morula und 27 junge Blastozysten) auf 15 Schafe übertragen, wovon 5 Transfers mit Methode 1 und 10 mit Methode 2 erfolgten.

Der Verschluß der Operationswunde erfolgte entsprechend dem bei der Embryogewinnung. Auch hier wurden die Wunden am Uterus, die durch Transfergerät oder Braunüle verursacht worden waren, nicht genäht. Die Schafe bekamen 4 ml Tetanusserum subkutan und 7 ml Bayrena intravenös verabreicht. Nach acht Tagen wurden die Fäden gezogen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Superovulation und Ovarreaktion

Vor jeder Spülung der Uteri im Zuge der Embryogewinnung wurden die Corpora lutea und Follikel (Blasen > 5 mm) erfaßt (Tab. 10).

An den Ovarien von 30 Merinolandschafen wurden durchschnittlich 10,3 Corpora lutea (3 bis 31) und 1,9 Follikel (0 bis 7) pro Tier gezählt, bei 38 Bergschafen nach 1. Superovulation 9,1 Corpora lutea (1 bis 20) und 1,5 Follikel (0 bis 6) pro Tier. Nach 2. Superovulation von 20 Bergschafen wiesen die Ovarien im Mittel 7,6 Corpora lutea (4 bis 15) und 2,5 Follikel (0 bis 6) auf.

Tab. 10: Ovarbefunde bei Berg- und Merinolandschafen nach Superovulation (SO) mit 18 mg FSH (5. und 6. Tag nach Bedeckung; $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Bergschafe 1. SO n = 38	Bergschafe 2. SO n = 20	Merinoland- schafe 1. SO n = 30	gesamt n = 88
Corpora lutea	9,1 $\pm$ 3,9	7,6 $\pm$ 3,2	10,3 $\pm$ 6,1	9,2 $\pm$ 4,7
Follikel	1,5 $\pm$ 1,7	2,5 $\pm$ 1,8	1,9 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 1,9

11 (36,7 %) der Merinolandschafe wiesen keinerlei Follikel auf, 3 (10 %) jeweils einen. Die übrigen 16 Schafe (53,3 %) hatten zwischen 2 und 7 Follikel. Von 38 Bergschafen waren 14, d.h. 36,8 % nach 1. Superovulation ohne Follikel und 8 (23,7 %) hatten jeweils einen. 15 Schafe (39,5 %) wiesen zwischen 2 und 6 Folli-

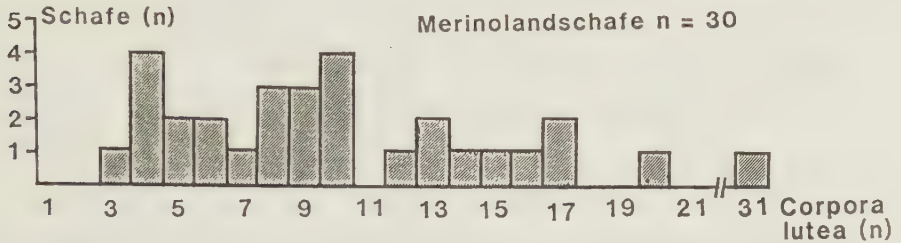


Abb. 8: Verteilung der Corpora lutea bei Merinolandschafen nach Superovulation mit 18 mg FSH (Tag 5 und 6 nach Bedeckung)

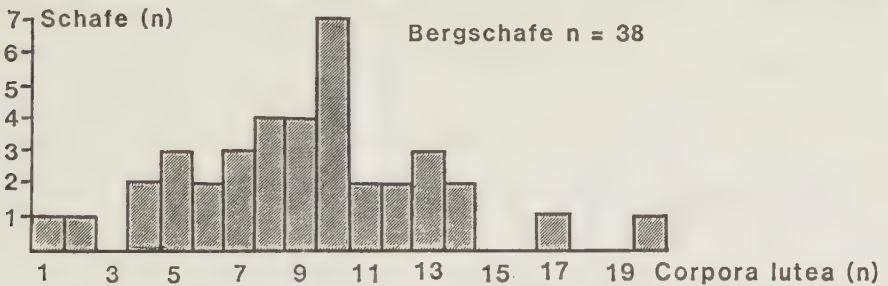


Abb. 9: Verteilung der Corpora lutea bei Bergschafen nach erster Superovulation mit 18 mg FSH (Tag 5 und 6 nach Bedeckung)

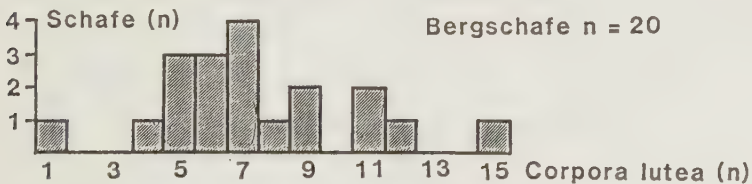


Abb. 10: Verteilung der Corpora lutea bei Bergschafen nach zweiter Superovulation mit 18 mg FSH (Tag 5 und 6 nach Bedeckung)

kel auf. Nach 2. Superovulation waren nur bei 2 Tieren (10 %) keine Follikel zu finden und bei 4 Tieren (29 %) ein Follikel. 14 Schafe (70 %) hatten zwischen 2 und 6 Follikel.

26 % der Merinolandschafe (MS) hatten zwischen 4 und 6 Corpora lutea, 30 % zwischen 8 und 10. 23 % der MS wiesen über 13 Gelbkörper auf (Abb. 8). Nach 1. Superovulation konnten bei 47 % der Bergschafe (BS) 7 bis 10 Corpora lutea und bei 23 % der BS 1 bis 6 Gelbkörper gezählt werden. Ebenfalls 23 % der BS hatten 11 bis 13 Corpora lutea, 10 % über 13 Gelbkörper (Abb. 9). Nach 2. Superovulation wurden bei 50 % der Bergschafe 5 bis 7 Corpora lutea gefunden. 30 % der BS wiesen zwischen 8 und 12 Gelbkörper auf, 5 % der Tiere über 13 (Abb. 10).

4.2. Embryogewinnungsrate

Die Embryogewinnungsrate, d.h. das Verhältnis der gezählten Corpora lutea zu den ausgespülten Embryonen und Oozyten betrug bei den nach erster Superovulation geschlachteten Merinolandschafen ($n = 30$) 62,5 % und bei den nach erster Superovulation geschlachteten Bergschafen ($n = 9$) 84,1 %. Nach Laparotomie und erster Superovulation lag die Embryogewinnungsrate bei den Bergschafen ($n = 29$) bei 45,6 %, nach 2. Superovulation, Schlachtung und Spülung ($n = 20$) am exstirpierten Uterus bei 47,0 %.

4.3. Embryogewinnung nach erster und zweiter Superovulation

Von 29, nach 1. Superovulation laparotomierten Bergschafen wurden 20 nochmals superovuliert und ca. 8 Wochen nach der ersten Spülung geschlachtet (Tab. 11).

Von 58 Spülungen waren 54 erfolgreich, bei einem der BS konnten nach Laparotomie und 1. Superovulation, bei drei BS nach 2. Superovulation weder Embryonen noch Oozyten ausgespült werden.

Bei den 29 zum ersten Mal superovulierten Tieren wurden zwar durchschnittlich 0,6 Oozyten gefunden, diese Oozyten (1 bis 12) stammten jedoch ausschließlich von 5 BS. Nur bei einem dieser BS wurde zusätzlich ein morphologisch intakter Embryo gefunden. Von 20 zum zweiten Mal superovulierten Bergschafen wurden im Durchschnitt 1,2 Oozyten (1 bis 9) gewonnen. Auch diese stammten von 5 BS die ausschließlich Oozyten aufwiesen (Tab. 11).

Tab. 11: Embryogewinnung bei Bergschafen nach 1. und 2. Superovulation (SO) mit 18 mg FSH (5. und 6. Tag nach Bedeckung; $\bar{x} \pm s$)

Parameter	1. SO (n = 29)	1. SO (n = 9)	2. SO (n = 20)
	Laparotomie	Schlachtung	Schlachtung
Embryonen Klasse A/B	2,9 $\pm$ 2,4	4,6 $\pm$ 3,8	1,4 $\pm$ 2,0
Embryonen Klasse C/D	0,7 $\pm$ 1,2	1,9 $\pm$ 2,5	1,0 $\pm$ 1,5
Oozyten	0,8 $\pm$ 2,5	-	1,2 $\pm$ 2,5
Befruchtungsrate (%)	82,0	100,0	67,6
Embryogewinnungsrate (%)	45,6	84,1	47,0

Befruchtungsrate: Embryonen / Embryonen + Oozyten (%)

Embryogewinnungsrate: Embryonen + Oozyten / Corpora lutea (%)

Während die Befruchtung nach 1. Superovulation zwischen 82 und 100 % lag, sank sie nach 2. Superovulation auf 67,6 % ab (Tab. 11).

Bei den 20 zum zweiten Mal superovulierten Bergschafen wiesen nach Schlachtung 4 Uteri, besonders im Bereich der Eileiter Verklebungen auf, die eine Spülung erheblich erschwerten. Weitere 13 Uteri hatten nur geringgradige Verklebungen, durch die eine Spülung jedoch nicht behindert wurde. Bei drei Uteri waren die Perforationswunden für den Spülkatheter an den Uterushörnern offen geblieben und das Endometrium hatte sich teilweise nach außen gestülpt. Eine Spülung dieser drei Uteri blieb erfolglos.

Nach 1. Superovulation konnten bei 21 (72,4 %) von 29 BS morphologisch intakte Embryonen gewonnen werden, nach 2. Superovulation bei 9 (45,0 %) von 20 Bergschafen

Im Mittel wurden nach 1. Superovulation und Laparotomie also 2,9 (0 bis 7), nach Schlachtung 4,6 (0 bis 10) morphologisch intakte Embryonen pro Bergschaf gewonnen. Bei Spülung am exstirpierten Uterus nach 2. Superovulation wurden noch 1,4 (0 bis 6) Embryonen der Klassen A/B pro BS gefunden (Tab. 11).

4.4. Ovarreaktion und Befruchtungsrate

Ein Zusammenhang zwischen Ovarreaktion und Auffinden unfruchteter Eizellen konnte bei den Bergschafen nicht gefunden werden.

Bei den Merinolandschafen wurden drei Gruppen gebildet, wobei der Gruppe A 9 Tiere mit 3 bis 6 Corpora lutea, der Gruppe B

14 Tiere mit 7 bis 13 und der Gruppe C 7 Tiere mit 14 bis 31 Corpora lutea zugeordnet wurden (Tab. 12).

Die Zahl der auf den Ovarien gefundenen Follikel betrug zum Zeitpunkt der Embryogewinnung 2,3 (Gruppe A), 1,6 (Gruppe B) und 2,0 (Gruppe C).

In Gruppe A wurden im Mittel 1,2 Embryonen der Klassen A und B sowie 1,2 Oozyten gefunden. In Gruppe B wurden 4,3 morphologisch intakte Embryonen und 1,2 Oozyten ausgespült. Bei den Schafen der Gruppe C waren 1,4 Embryonen der Klassen A/B pro Tier sowie 9,3 Oozyten zu finden. Die gewonnenen morphologisch intakten Embryonen stammten dabei von einem einzigen Tier dieser Gruppe. Bei 5 anderen MS aus Gruppe C wurden ausschließlich Oozyten, bei einem weiteren Tier Oozyten in Verbindung mit Embryonen der Klassen C/D ausgespült.

Die Befruchtungsrate betrug in Gruppe A 57,7 %, in Gruppe B 81,3 % und sank in Gruppe C auf 16,9 % (Tab. 12).

Tab. 12: Anzahl Corpora lutea (C.l.) im Verhältnis zu Follikeln, morphologisch intakten Embryonen und Oozyten ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
	(n = 9)	(n = 14)	(n = 7)
	3 - 6 C.l.	7 - 13 C.l.	14 - 31 C.l.
Follikel	2,3 $\pm$ 2,1	1,6 $\pm$ 1,9	2,0 $\pm$ 2,5
Embryonen Klasse A/B	1,2 $\pm$ 1,1	4,3 $\pm$ 3,6	1,4 $\pm$ 3,8
Oozyten	1,2 $\pm$ 1,8	1,2 $\pm$ 2,6	9,3 $\pm$ 8,9
Befruchtungsrate (%)	57,7	81,3	16,9

4.5. Morphologie

Von 121, an Tag 5 gewonnenen Morulae waren 90 (74,4 %) morphologisch intakt, also in Klasse A oder B einzuordnen. Von 191, an Tag 6 gewonnenen kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten waren 144 (75,4 %) den Klassen A oder B zuzuteilen.

4.6. Kultivierung der Embryonen

4.6.1. Morulae "Tag 5"

Insgesamt wurden 55, am 5. Tag nach Bedeckung gewonnene Morulae der Klassen A (n = 39), B (n = 10) und C (n = 6) kultiviert (Tab. 13). 10 Morulae (18,2 %) entwickelten sich bis zur expandierten oder geschlüpften Blastozyste.

7 der als Klasse A, 3 der als Klasse B und keine der als Klasse C beurteilten Morulae wuchsen in Kultur.

Die Anzahl der Embryonen, die sich in vitro zur geschlüpften bzw. expandierten Blastozyste entwickelten, betrug in den einzelnen Kulturmedien 1 von 10 (HAMS F-10 + FCS), 3 von 9 (HAMS F-10 + BSA), 4 von 11 (mKRBL + FCS) und 2 von 25 (mKRBL + BSA).

Es entwickelten sich 4 von 19 Embryonen (21,1 %) in HAMS F-10 und 6 von 36 in mKRBL (16,7 %). Bei FCS-Zusatz wuchsen 5 von 21 (23,1 %), bei BSA-Zusatz 5 von 34 (13,9 %) Morulae zu expandierter bis geschlüpfter Blastozyste.

Tab. 13: In vitro-Entwicklung von 55 Morulae (Tag 5) zu expandierten oder geschlüpften Blastozysten nach 72 Stunden Kultur in unterschiedlichen Medienzusammensetzungen

KLASSE	HAMS F-10		mKRBL		gesamt
	FCS 0*/72**	BSA 0*/72**	FCS 0*/72**	BSA 0*/72**	
A	5 / 0	9 / 3	5 / 2	19 / 2	39 / 7
B	2 / 1	- / -	5 / 2	3 / 0	10 / 3
C	2 / 0	- / -	1 / 0	3 / 0	6 / 0
gesamt (%)	10 / 1 10	9 / 3 33,3	11 / 4 36,4	25 / 2 8	55 / 10 18,2

* Beginn der Kultivierung

** nach 72-stündiger Kultur zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste weiterentwickelt

4.6.2. Kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten "Tag 6"

Von 44, an Tag 6 nach Bedeckung gewonnenen kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten entwickelten sich 35 (79,5 %) zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste.

15 (100 %) der in Klasse A und 13 (92,9 %) der in Klasse B eingestuften Embryonen wuchsen in Kultur, jedoch nur 7 (46,7 %) der 15 kompaktierten Morulae aus Klasse C.

Von 10, in HAMS F-10 + FCS kultivierten kompaktierten Morulae entwickelten sich 8, von 9 in HAMS F-10 + BSA kultivierten kompaktierten Morulae 9, von 13, in mKRBL + FCS kultivierten kom-

paktierten Morulae und beginnenden Blastozysten 10 und von 12, in mKRBL + BSA kultivierten kompaktierten Morulae bzw. beginnenden Blastozysten 8 zur expandierten bzw. geschlüpften Blastozyste.

In HAMS F-10 entwickelten sich 17 von 19 Embryonen (89,5 %), in mKRBL 18 von 25 (72 %). Bei Zusatz von FCS wuchsen 18 von 23 (78,3 %), bei Zusatz von BSA 17 von 21 (80,9 %) kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste.

Tab. 14: In vitro-Entwicklung von Embryonen "Tag 6" zu expandierten oder geschlüpften Blastozysten nach 72 Stunden Kultur in unterschiedlichen Medienzusammensetzungen

KLASSE	HAMS F-10		mKRBL		gesamt
	FCS 0*/72**	BSA 0*/72**	FCS 0*/72**	BSA 0*/72**	
A	4 / 4	3 / 3	7 / 7	- / -	14 / 14
B	3 / 3	3 / 3	4 / 3	5 / 5	15 / 14
C	3 / 1	3 / 3	2 / 0	7 / 3	15 / 7
gesamt (%)	10 / 8 80	9 / 9 100	13 / 10 76,9	12 / 8 66,7	44 / 35 79,5

* Beginn der Kultivierung

** nach 72-stündiger Kultur zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste weiterentwickelt

4.7. Tiefgefrieren der Embryonen

4.7.1. Morulae "Tag 5"

Von 12 tiefgefrorenen Morulae der Klasse A bzw. 29 der Klasse B befanden sich nach dem Auftauen 5 in Klasse A, 9 in Klasse B, 7 in Klasse C und 14 in Klasse D. 6 Embryonen gingen durch Platzen der Pailletten verloren (Tab. 15).

3 Morulae der Klasse B und 7 der Klasse C wurden in mKRBL + FCS kultiviert. 1 Morula (Klasse B) entwickelte sich zu einer geschlüpften und 2 Morulae (Klasse C) zu expandierten Blastozysten.

Tab. 15: Ergebnisse nach Auftauen der Morulae von Tag 5

Beurteilungszeitpunkt	Morphologische Bewertung				gesamt
	A	B	C	D	
vor Tiefgefrieren	12	29	-	-	41
nach Auftauen	5	9	7	14	35*
Transfer	5	6	-	-	11
Kultur 0**	-	3	7	-	10
72***	-	1	2	-	3

* durch Zerreißen der Pailletten wurden 6 Embryonen verloren

** Beginn der Kultivierung

*** expandierte oder geschlüpfte Blastozysten nach 72-stündiger Kultur

Auf 4 Schafe wurden dreimal 3 und einmal 2 Morulae übertragen. Ein männliches Lamm wurde geboren. Es stammte aus 1 von 3 Morulae, die nach 2. Superovulation am Schlachthof von einem

Bergschaf gewonnen und anschließend "per Hand" im Alkoholbad tiefgefroren worden waren (Tab. 15).

4.7.2. Kompaktierte Morulae und beginnende Blastozysten "Tag 6"

65 (67,4 %) der 95 tiefgefrorenen Embryonen von Tag 6 waren nach dem Auftauen noch in Klasse A oder B einzustufen. 14 Embryonen befanden sich in Klasse C, 9 in Klasse D, 7 Embryonen gingen durch Platzen der Pailletten verloren (Tab. 16).

Von den 53 beginnenden Blastozysten waren noch 42 (77,4 %), von den 42 kompaktierten Morulae noch 23 (54,8 %) in den Klassen A bzw. B.

Tab. 16: Verteilung kompaktierter Morulae (kMor) und beginnender Blastozysten (bBlz) in den einzelnen Bewertungsklassen vor und nach Tiefgefrierkonservierung (TG)

Klasse	vor TG		nach TG	
	kMor	bBlz	kMor	bBlz
A (%)	21(50,0)	40(75,5)	5(12,8)	16(32,7)
B (%)	21(50,0)	13(24,5)	18(46,2)	26(53,1)
C (%)	-	-	10(25,6)	4 (8,2)
D (%)	-	-	6(15,4)	3 (6,1)
gesamt	42	53	39*	49*

* 3 kMor A und 4 bBlz B gingen durch Platzen der Pailletten verloren

17 (68,0 %) der nach dem Auftauen in mKRBL + FCS kultivierten 25 Embryonen (Klasse A und B 17 Embryonen, Klasse C 8 Em-

bryonen) entwickelten sich zur expandierten bzw. geschlüpften Blastozyste. Von den 17 Embryonen der Klassen A und B entwickelten sich in Kultur 16, d.h. 94,1 % zur expandierten oder geschlüpften Blastozyste, von 8 Embryonen der Klasse C aber nur 1 Embryo (Tab. 17).

Tab. 17: Ergebnisse nach Auftauen und 72 Stunden Kultur (mKRBL mit 10 % FCS) von an Tag 6 gewonnenen kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten

Beurteilungszeitpunkt	Morphologische Bewertung			gesamt
	A	B	C	
vor Tiefgefrieren	10 (3)*	15 (4)*	-	25 (7)
nach Auftauen	1 (0)	16 (3)	8 (4)	25 (7)
expandierte/geschlüpfte Blz	1 (0)	15 (2)	1 (0)	17 (2)

* () Anteil der kompaktierten Morulae

Nach Transfer von 47 Embryonen auf 15 Schafe wurden 2 (13,3 %) trächtig und brachten 3 männliche Lämmer (6,4 %) zur Welt. Auf beide Schafe waren je 3 Embryonen übertragen worden, auf das eine 2 beginnende Blastozysten und 1 kompaktierte Morula, auf das andere 1 beginnende Blastozyste und 2 kompaktierte Morulae. Ersteres bekam Zwillinge, das zweite Schaf ein einzelnes Lamm. Die Zwillinge stammten aus nach Laparotomie, das einzelne Lamm aus nach Schlachtung am exenterierten Uterus gewonnenen Embryonen.

5. DISKUSSION

Die Bedeutung des Embryotransfers und der Tiefgefrierkonservierung von Schafembryonen liegt insbesondere in der Anlage von Embryobanken zum Schutz gefährdeter Rassen bzw. in der Erhaltung eines möglichst großen genetischen Pools sowie in der Erleichterung von Im- und Export. Nach wie vor bleiben hierfür Superovulation und Embryogewinnung die limitierenden Faktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Möglichkeiten einer Superovulation mit FSH, d.h. die mit dieser Methode zu gewinnende Anzahl morphologisch intakter, also für Konservierung und Transfer "tauglicher" Embryonen bei Berg- und Merinolandschafen überprüft. Neben der Zahl der Corpora lutea als direktem Maßstab für den Erfolg der Superovulation ist auch die Zahl der persistierenden Follikel (>5 mm) zum Zeitpunkt der Embryogewinnung von Interesse, da beide zusammen die eigentliche Ovarreaktion auf eine Hormonbehandlung repräsentieren. Das Verhältnis beider Parameter zueinander gibt Hinweise, inwiefern eine Stimulation den Ovulationsvorgang beeinflusst. Tritt an einem Ovar neben den Corpora lutea eine größere Anzahl persistierender Follikel auf, könnten diese durch anhaltend hohe Östrogenausschüttung bzw. eine Verschiebung des Progesteron/Östrogenverhältnisses einen negativen Einfluß sowohl auf die letzte Phase der Eizellreifung und damit der Ovulation als auch auf Befruchtung und frühembryonale Entwicklung im Eileiter zur Folge haben (MEINECKE-TILLMANN et al. 1983).

Nach Synchronisation mit Vaginalschwämmen (40 mg FGA) und Superovulation mit einer Gesamtdosis von 18 mg FSH konnten im Mittel bei den Bergschafen $9,1 \pm 3,9$ Corpora lutea (C.l.) und $1,5 \pm 1,7$ Follikel gezählt werden, bei den Merinolandschafen $10,3 \pm 6,1$ C.l. und $1,9 \pm 1,9$ Follikel. Die Merinolandschafe reagierten also im Durchschnitt zwar geringfügig besser als die Bergschafe, jedoch mit erheblich größerer Schwankungsbreite. Die in diesen Untersuchungen festgestellte Zahl persistierender Follikel ist, auch in Relation zur Zahl der Corpora lutea, nicht erheblich. Daraus kann gefolgert werden, daß die hier angewandte Methode der Superovulation den Ovulationsvorgang bzw. die zur Ovulation notwendigen endokrinologischen Vorgänge nicht entscheidend beeinträchtigt.

Bei beiden hier verwendeten Schafrassen konnten keine unterschiedlichen Ovarreaktionen in den verschiedenen Jahreszeiten beobachtet werden. Bei saisonalen Schafen fanden TORRES et al. (1987) während der Paarungssaison signifikant mehr Corpora lutea als außerhalb der Paarungssaison.

ARMSTRONG und EVANS (1983) erzielten mit einer Gesamtmenge von 20-24 mg FSH bei Suffolk-Schafen $11,3 \pm 0,9$ C.l., bei Merinolandschafen $16,6 \pm 3,7$ C.l. und bei Romney-Schafen $8,2 \pm 2,0$ Corpora lutea ($\bar{x} \pm s$). BODE (1985) fand nach Gaben von insgesamt 20 mg FSH bei Schwarzkopfschafen $4,6 \pm 4,9$ C.l. und 1,0 Follikel, bei Finnschaf/Schwarzkopf-Kreuzungen $12,3 \pm 10,7$ C.l. mit 2,1 Follikeln ($\bar{x} \pm s$). Während sich auch bei BODE (1985) große Schwankungsbreiten in der Anzahl Corpora lutea bei den einzelnen Schafen zeigten, lagen die individuellen Unterschiede der Ovarreak-

tionen bei ARMSTRONG und EVANS (1983) wesentlich niedriger. Allerdings war die Variation bei den Merinolandschaften größer als bei den anderen Rassen.

Die Superovulation mit PMSG führt zu ähnlichen Ergebnissen. Zwar muß PMSG, im Gegensatz zu FSH, nur einmal injiziert werden, jedoch beobachteten ARMSTRONG und EVANS (1983) noch größere individuelle Reaktionsunterschiede als bei FSH. Auch traten vermehrt Hyperstimulationen in Form persistierender Follikel an den Ovarien auf. BODE (1985) konnte bei Schwarzkopfschafen keine Unterschiede in der Reaktion auf PMSG oder FSH finden. Kreuzungen aus Finn- und Schwarzkopfschafen reagierten aber bei FSH mit mehr persistierenden Follikeln und größeren Schwankungen der Anzahl Corpora lutea als bei PMSG.

Die durchschnittliche Ovarreaktion in diesen Untersuchungen war zufriedenstellend ($9,2 \pm 4,7$), jedoch großen individuellen Schwankungen unterworfen. Auch ein gewisser Rasseeinfluß ist nicht auszuschließen. Diese Umstände machten sich bei den Ergebnissen der Embryogewinnung noch mehr bemerkbar. Als Parameter für den Erfolg dieser Maßnahme wird allgemein die sogenannte Embryo- oder Eigewinnungsrate verwendet. Beide Ausdrucksweisen sind eigentlich nicht korrekt, da sich die "Gewinnungsrate" auf die Zahl der bei der Spülung gewonnenen Embryonen und der unbefruchteten Eizellen bezieht. Da jedoch in der einschlägigen Literatur diese Ausdrücke allgemein verwendet werden, sind diese Bezeichnungen auch hier benutzt worden.

Für eine Embryogewinnung durch Spülung des Uterus sind beim Schaf mehrere Methoden beschrieben. Prinzipiell kann eine Spülung

chirurgisch oder nach Schlachtung erfolgen. Spülungen via cervix (COONROD et al. 1986) oder mit Hilfe eines Dauerkatheters (MUTIGA et al. 1983) erwiesen sich bisher als nicht geeignet.

Während TERVIT und HAVIK (1976), SMITH und MURPHY (1984) sowie BODE (1985) bei Spülungen nach Laparotomie mittels Ballonkatheter Embryogewinnungsraten (EGR) zwischen 65,3 und 82,9 % erzielten, konnten bei den Bergschafen im Rahmen dieser Versuche mit derselben Methode nur 45,6 % der Embryonen ausgespült werden. ROWSON et al. (1969) entwickelten eine Methode zur Spülung exenterierter Uteri beim Rind. Mit der gleichen Spülmethode erreichten WRIGHT et al. (1969) beim Schaf eine EGR von 62,2 %. In den eigenen Untersuchungen wurde diese Technik übernommen und bei den Merinolandschafen eine EGR von 62,5 %, bei den Bergschafen eine EGR von 84,1 % erzielt. Nach vorausgegangener Spülung mittels Laparotomie sank die EGR nach Schlachtung auf 47 %, da die Spülungen teils durch Verklebungen (20 %), teils durch nicht verheilte Uteruswunden (15 %) erschwert wurden, d.h. nur bei 65 % der Schafe waren einwandfreie Spülungen durchzuführen. Die Ergebnisse der Embryogewinnung bei den Bergschafen nach Laparotomie (45,6 %) bzw. Schlachtung (84,1 %) weisen auf die technischen Probleme der Uterusspülung am lebenden Tier hin. Da andererseits die Fruchtbarkeit der Tiere durch diese chirurgische Maßnahme nicht wesentlich beeinträchtigt wurde - bei 13 von 20 operierten Tieren wurden später im Zuge der Schlachtung Embryonen gefunden - ist der Einsatz einer Laparotomie bei Tieren, die weiter züchterisch genutzt werden sollen, durchaus möglich. Andernfalls ist die Embryogewinnung im Rahmen der Schlachtung sicherlich wesentlich

einfacher und effektiver.

Vielversprechend scheint sich die Embryogewinnung mit Hilfe der Laparoskopie zu entwickeln. Die EGR liegen zum Teil zwar noch relativ niedrig, jedoch ist diese Methode für die Tiere weit weniger belastend als eine Laparotomie. Sie ermöglicht, durch schonende Behandlung von Schaf und Uterus, mehrmalige Spülungen bei erhaltener Fruchtbarkeit (CAPEHART et al. 1984; MC KELVEY et al. 1986).

Die Angaben über im Durchschnitt gefundene Embryonen schwanken bei den einzelnen Autoren in großem Maße. Da oftmals nicht zwischen morphologisch intakten und degenerierten Embryonen unterschieden wird, ist ein kritischer Vergleich der einzelnen Methoden nur in gewissen Grenzen möglich. So konnte BODE (1985) von ursprünglich 46 superovulierten Tieren 39 erfolgreich spülen und bei diesen 3,7 "taugliche" Embryonen pro Schaf gewinnen. SMORAG et al. (1982) spülten 1,5 morphologisch intakte Embryonen pro Schaf aus, SMITH (1984) 7,7 pro Tier.

Im Verlauf dieser Untersuchungen wurden bei Bergschafen nach Laparotomie im Durchschnitt 2,9, nach Schlachtung 4,6 morphologisch intakte Embryonen pro Tier gefunden, auch dies mit großen individuellen Schwankungen. Die Befruchtungsrate lag bei 82 bzw. 100 %. Ursache für die geringere Anzahl tauglicher Embryonen nach Laparotomie ist die niedrigere Eigewinnungsrate. Nach zweiter Superovulation sank die Befruchtungsrate auf 67,6 % und es konnten nur noch 1,4 Embryonen der Klassen A/B pro Tier ausgespült werden. Die abnehmende Befruchtungsrate ist auf die bereits erwähnten Verklebungen im Bereich der Eileiter bzw. die nicht verheil-

ten Perforationswunden am Uterus zurückzuführen. Bei den Merinolandschaften wurden im Mittel 2,7 morphologisch intakte Embryonen gefunden. Die Befruchtungsrate betrug 52,3 %. Nach Aufschlüsselung in Gruppen zeigte sich, daß Tiere mit mäßiger (3-6 C.l.) oder extremer (14-31 C.l.) Ovarreaktion weniger taugliche Embryonen pro Tier lieferten, als Merinolandschaften mit guter Ovarreaktion (7-13 C.l.), bei denen durchschnittlich 4,3 morphologisch intakte Embryonen zu finden waren. "Normal" reagierende Tiere wiesen eine Befruchtungsrate von 81,3 % auf, überreagierende Merinolandschaften eine Befruchtungsrate von 16,9 %. Die unterschiedlichen Befruchtungsraten sind unabhängig von den Böcken, da diese in allen Gruppen eingesetzt und nachweislich fruchtbar waren sowie in regelmäßigen Abständen einer Spermauntersuchung unterzogen wurden. Es muß daher ein spezifisch negativer Einfluß der extrem hohen Ovarstimulation auf den Vorgang der Befruchtung angenommen werden, ohne daß eine Aussage über die Ursachen dieses Phänomens getroffen werden kann.

ARMSTRONG und EVANS (1983) fanden bei Merinoschafen durchschnittlich 2,9 Embryonen (bei Suffolk-Schafen 5,3) und hatten bei Tieren mit mehr als 16 Corpora lutea rapide sinkende Befruchtungsraten zu verzeichnen. Auch hier neigten die Merinoschafe zu Überreaktionen. MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN (1986) erreichten bei Merino/Schwarzkopf-Kreuzungen eine Befruchtungsrate von 60,5 %, BODE (1985) bei Schwarzkopf- und Finn/Schwarzkopfschafen eine Befruchtungsrate von 54,1 %. ARMSTRONG und EVANS (1984) erzielten mit Suffolk/White-Face-Kreuzungen eine Befruchtungsrate von 95,4 %.

MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN (1986) sehen die Ursache schlechter Befruchtungsraten u.a. in Störungen der Spermienpassage bzw. des Spermatransportes im unteren Abschnitt der Tuba uterina, d.h. in der Verhinderung einer zeitgerechten Begegnung der Gameten im Eileiter. EVANS und ARMSTRONG (1984) stellten bei superovulierten Schafen ebenfalls eine signifikante Verminderung der Anzahl rückgewonnener Spermien fest.

Um bei superovulierten Schafen gute Befruchtungsergebnisse zu erzielen wird mit Frisch- oder Tiefgefriersperma mittels Laparoskopie intrauterin besamt. Mit Frischsperma wurden Befruchtungsraten zwischen 83,3 (ARMSTRONG und EVANS 1984) und 93,7 % (MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN 1986) erreicht, mit Tiefgefriersamen eine Befruchtungsrate von 50 % (ARMSTRONG und EVANS 1984).

Die unterschiedlichen Ovarreaktionen der einzelnen Schafrassen weisen daraufhin, daß sowohl das zu verwendende Hormon selbst als auch Gesamtdosis und Verabreichungsschema den einzelnen Rassen anzupassen sind und nicht unbedingt von einer auf die andere Rasse übertragen werden können. Die Befruchtungsrate ist von der Schafrasse, der Ovarreaktion der Tiere und wohl nicht zuletzt von deren Alter, d.h. vom Gesundheitszustand bzw. der Belastungsfähigkeit des Uterus abhängig. In den eigenen Untersuchungen wurde durch Belegung eine zufriedenstellende Befruchtungsrate erzielt. Die Ausnahme stellten Merinoschafe mit einer hohen Anzahl Corpora lutea dar. Eventuell sind durch Anwendung der intrauterinen Besamung mit Frischsperma gerade bei Problemrassen bzw. -tieren bessere Ergebnisse möglich.

Weitgehend unabhängig von der Ovarreaktion war die nach mor-

phologischen Kriterien beurteilte Qualität der Embryonen. Die subjektive Einteilung in morphologische Klassen wurde durch die Ergebnisse der in vitro Kultivierung, vor allem bei den an Tag 6 gewonnenen Embryonen, bestätigt. Bei 6 Tage alten kompaktierten Morulae und beginnenden Blastozysten entwickelten sich 100 % der in Klasse A, 92,9 % der in Klasse B und 46,7 % der in Klasse C eingestuften Embryonen. Ein Vergleich der Medien ergab bei 6 Tage alten Embryonen keinen deutlichen Unterschied im Embryonenwachstum. Die Ursache für das eingeschränkte Wachstum der 5 Tage alten Morulae konnte im Rahmen dieser Untersuchungen nicht geklärt werden. Weder der Einsatz eines komplexen Mediums wie HAMS F-10, noch ein Wechsel des Proteinzusatzes führte zu Verbesserungen der Kultivierungsergebnisse. Das gute Wachstum der an Tag 6 gewonnenen Embryonen läßt sich eventuell daraus erklären, daß der möglicherweise entscheidende Schritt der Blastulation bereits vollzogen ist und so das weitere Wachstum für eine gewisse Zeitspanne fast "automatisch" abläuft.

BUNCH et al. (1984) erzielten ähnliche Ergebnisse. Sie kultivierten an Tag 5 und 6 gewonnene Morulae und beginnende Blastozysten in PBS + FCS. Von den Morulae entwickelten sich 37,5 %, von den beginnenden Blastozysten 70,6 % zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste.

Die Ergebnisse der Kultur von tiefgefrorenen Embryonen bestätigen die Erfahrungen, die mit "frischen" Embryonen gemacht wurden. Von den an Tag 5 gewonnenen Morulae waren 34 % nach dem Auftauen noch in Klasse A oder B einzuteilen. In Kultur wuchsen von 10 Morulae der Klassen B und C 3 (30 %) zu expandierter oder ge-

schlüpfter Blastozyste. Von den an Tag 6 gewonnenen Embryonen waren nach dem Tiefgefrieren noch 54,8 % der kompaktierten Morulae und 77,4 % der beginnenden Blastozysten morphologisch intakt. In Kultur entwickelten sich 94 % der in Klasse A oder B und 12,5 % der in Klasse C eingeteilten Embryonen zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste. Daraus ist zu folgern, daß die morphologische Beurteilung auch bei tiefgefrorenen Embryonen eine gewisse Aussage über deren Lebensfähigkeit erlaubt.

SCHIEWE et al. (1985) verwendeten ebenfalls Glyzerin als Gefrierschutzmittel und Sucrose für die Ausverdünnung. Nach 24 Stunden Kultur erzielten sie Überlebensraten zwischen 60 und 95 %. WARE und BOLAND (1987) benutzten zum Tiefgefrieren 1,4 M Glyzerin und für die Ausverdünnung 0,25, 1 und 2 M Sucrose. Nach dem Auftauen waren noch 9 von 23, 21 von 26 und 13 von 23 Embryonen morphologisch intakt. Zufriedenstellende Entwicklungsraten in vitro wurden jedoch ausschließlich mit den Embryonen erzielt, die mit 1,4 M Glyzerin und 1 M Sucrose tiefgefroren worden waren.

Die Ergebnisse der Embryokultivierung nach Tiefgefrierkonservierung entsprechen damit weitgehend den in der Literatur gemachten Angaben und weisen darauf hin, daß das in dieser Arbeit verwendete Tiefgefrierverfahren für Schafembryonen im Stadium der kompaktierten Morula und beginnenden Blastozyste (Tag 6) geeignet ist. Die Überlebensrate 5 Tage alter Morulae nach Tiefgefrierkonservierung erwies sich als zu gering. Allerdings muß nach den Ergebnissen der Kultur "frischer" Embryonen des gleichen Stadiums angenommen werden, daß die In vitro-Kultur von Tiefgefrierembryonen keinen aussagekräftigen Parameter für die Lebensfähigkeit

junger Morulae darstellt.

Der Transfer tiefgefrierkonservierter Embryonen führte unabhängig vom Embryonalstadium zu unbefriedigenden Ergebnissen. Es ist, auch auf Grund der morphologischen Beurteilung der Embryonen nach dem Auftauen, möglich, daß das angewendete Einfrierverfahren für Embryonen von Tag 5 nicht geeignet ist. Die ungünstigen Transferergebnisse mit Embryonen von Tag 6 nach Tiefgefrierkonservierung stehen jedoch im Widerspruch zu den guten Überlebensraten *in vitro*.

Inwiefern durch eine Änderung des Tiefgefrierverfahrens oder des Gefrierschutzmittelzusatzes eine Verbesserung dieser Ergebnisse möglich ist, muß in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten zur Tiefgefrierkonservierung von Schafembryonen am Modell eines One-Step-Einfrierverfahrens überprüft.

Bei 38 Berg- und 30 Merinolandschaften erfolgten nach Zyklus-synchronisation (Chronogest^R-Vaginalschwämmchen) und Superovulation (18 mg FSH) insgesamt 88 Spülungen ($\bar{x}$ = 9,2 Corpora lutea). Bei 29 Bergschafen wurde die Embryogewinnung mittels Laparotomie durchgeführt ($\bar{x}$ = 2,6 morphologisch intakte Embryonen). 20 dieser Bergschafe wurden ein zweites Mal superovuliert und die Embryonen nach Schlachtung gewonnen ($\bar{x}$ = 1,4 morphologisch intakte Embryonen). 9 Berg- und 30 Merinolandschafe wurden nur nach Schlachtung einer Embryogewinnung unterzogen ($\bar{x}$ = 4,6 bzw. 2,7 morphologisch intakte Embryonen). Merinolandschafe mit extremer Ovarreaktion (>13 Corpora lutea) wiesen eine schlechte Befruchtungsrate auf.

Die Kultur "frischer" Embryonen wurde mit mKRBL bzw. HAMS F-10 und einem Proteinzusatz von BSA oder FCS durchgeführt. Die Entwicklungsrate zu expandierter oder geschlüpfter Blastozyste betrug bei jungen Morulae (Tag 5) 18,2 %, gegenüber 79,5 % bei kompaktierten Morulae bzw. beginnenden Blastozysten (Tag 6).

Insgesamt wurden 41 Embryonen an Tag 5 und 95 Embryonen an Tag 6 nach dem Östrus mittels eines One-Step-Verfahrens tiefgefroren.

Hierfür wurden Minipailletten zu 1/3 mit mPBS + 20 % FCS + 1,4 M Glyzerin (Tiefgefriermedium) und den darin enthaltenen Embryonen (1-3) sowie zu 2/3 mit mPBS + 20 % FCS + 0,5 M Sucrose (Ausverdünnungsmedium) gefüllt. Anschließend wurden die Pailletten in das auf -5°C vorgekühlte Tiefgefriergerät eingesetzt und nach 5 Minuten Äquilibration das Seeding ausgelöst. Es folgten 10 Minuten Äquilibration, Kühlung bis -32°C mit einer Rate von $0,3^{\circ}\text{C}$ pro Minute, nochmals 25 Minuten Äquilibration und Umsetzen der Pailletten in flüssigen Stickstoff. Das Auftauen erfolgte in einem Wasserbad von $+32^{\circ}\text{C}$ für ca. 10 Sekunden.

Aufgetaute Embryonen von Tag 5 zeigten in Kultur eine Entwicklungsrate von 30 %, gegenüber 68 % bei Embryonen von Tag 6. Aus 11 auf 4 Schafe übertragenen Morulae (Tag 5) wurde 1 Lamm geboren. Aus den 47 "Tag 6-Embryonen", die nach dem Auftauen auf 15 Schafe übertragen wurden, resultierten 2 trächtige Schafe, die 3 Lämmer gebaren.

Potentielle Einsatzgebiete für die Tiefgefrierkonservierung von Embryonen beim Schaf sind derzeit die Anlage von Genreserven sowie die Erleichterung von Im- und Export. Wie diese Untersuchungen zeigen, sind bei den Teilschritten Embryogewinnung, Tiefgefrierkonservierung und Transfer Verbesserungen nötig, um einen praktischen Einsatz dieser Verfahren zu ermöglichen.

7. SUMMARY

"Studies on superovulation, embryo recovery, in vitro-culture and deep-freezing of sheep embryos"

The possibilities of deep-freezing sheep embryos with a one-step freezing method were evaluated in this study.

A total of 38 mountain and 30 merino ewes were synchronized with vaginal sponges (Chronogest^R) and superovulated using a total dose of 18 mg FSH. 88 flushings revealed an average ovarian response of 9.2 corpora lutea. An average of 2.6 intact embryos was recovered surgically from 29 of the mountain sheep. Of these ewes 20 were superovulated a second time and an average of 1.4 good quality embryos was recovered at slaughter. After first superovulation an average of 4.6 intact embryos were collected at slaughter from 9 mountain sheep and an average of 2.7 intact embryos from 30 merino ewes. Results showed that merino ewes exhibiting extreme ovarian responses (> 13 corpora lutea) have poor fertilization rates.

HAMS F-10 or mKRBL containing either BSA or FCS as supplement protein were used for culture of "fresh" embryos. The growth rate to expanded or hatched blastocysts was 18.2 % for young morulae (day 5) and 79.5 % for compacted morulae or beginning blastocysts (day 6).

A total of 41 "day-5" and 95 "day-6" embryos (day 0 = estrus) were frozen using a one-step freezing procedure. French straws were filled one-third with cryoprotectant solution (mPBS + 20 % FCS + 1,4 M glycerol) containing 1-3 embryos and two-thirds with the sucrose solution for cryoprotectant removal (mPBS + 20 % FCS + 0,5 M sucrose). The straws were placed in a freezer precooled to -5°C and seeded after 5 minutes of equilibration. Another 10 minutes equilibration followed. Then straws were cooled to -32°C at a rate of 0.3°C/min. After 25 minutes of equilibration, straws were finally plunged into liquid nitrogen. All straws were thawed by being plunged into a water bath at +32°C and held for about 10 seconds.

After thawing 30 % of the "day-5" embryos and 68 % of the "day-6" embryos developed in culture. Transfer of 11 "day-5" embryos to 4 recipient ewes resulted in a single birth with one lamb. Transfer of 47 "day-6" embryos to 15 ewes resulted in two pregnancies. Three lambs were born.

Main reasons for deep-freezing sheep embryos are to preserve important sheep genotypes and to simplify export and import. Nevertheless, this study reveals the need for improvement of techniques for recovery, storage and transfer of sheep embryos, if these procedures should be used practically.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ARMSTRONG, D.T. and G. EVANS (1983)
Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats
Theriogenology 19, 31-42
- ARMSTRONG, D.T. and G. EVANS (1984)
Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes
J. Reprod. Fert. 71, 89-94
- BETTERBED, B. and R.W. WRIGHT, Jr. (1985)
Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres
Theriogenology 23, 547-553
- BILTON, R.J. and N.W. MOORE (1976)
Effects of ice seeding and of freezing and thawing rate on the development of sheep embryos stored at -196°C
Theriogenology 6, 635
- BODE, G.W. (1985)
Superovulation und Eigewinnung bei Schafen mit unterschiedlicher Fortpflanzungsleistung nach Stimulation mit PMSG und FSH
Vet. med. Diss., Berlin
- BONDIOLI, K.R. and R.W. WRIGHT, Jr. (1983)
In vitro fertilization of ovulated and ovarian oocytes
J. Anim. Sci. 57, 1006-1012
- BOONE, W.R., J.F. DICKEY, L.J. LUSZCZ, J.R. DANTZLER and J.R. HILL, Jr. (1978)
Culture of ovine and bovine ova
J. Anim. Sci. 47, 908-913
- BRAUN, J. (1977)
Untersuchungen über den Einfluß der Superovulation auf Morphologie, Kultivierung und Tiefgefrierkonservierung von Eizellen beim Kaninchen
Vet. med. Diss., München
- BRAUN, J. (1985)
Künstliche Besamung beim Schaf
Der Bayerische Schafhalter 9, 116-118
- BUNCH, T.D., W.C. FOOTE, J.W. CALL and W.F. CLARK (1984)
In vitro culture and maintenance of ovine embryos transported in Dulbecco's enriched phosphate-buffered saline
Theriogenology 21, 981-987

- CAPEHART, J.S., M.J. BOWEN, J.W. BASSETT, J.M. SHELTON and D.C. KRAEMER (1984)
A modified technique for the collection of uterine stage ovine embryos
Theriogenology 21, 227
- CHUPIN, D., B. FLORIN and R. PROCUREUR (1984)
Comparison of two methods for one-step in-straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts
Theriogenology 21, 455-459
- COGNIE, Y. and S. TORRES (1984)
Ovarian response, ova recovery and fertilization rate after superovulation with FGA and pFSH in the ewe
In: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., 10-14 Jun, U Il Urbana-Campaign, Vol. 3, paper no. 311, 3 p
- COGNIE, Y., D. CHUPIN and J. SAUMANDE (1985)
Comparison of two FSH treatment schedules to induce superovulation in ewes
Theriogenology 23, 185
- CONROOD, S.A., B.R. COREN, B.L. MC BRIDE, M.J. BOWEN and D.C. KRAEMER (1986)
Successful non-surgical collection of ovine embryos
Theriogenology 25, 149
- DEDIE, K. und H. BOSTEDT (1985)
Biotechnische Verfahren in der Schafhaltung
In: Schafkrankheiten, 297-311, Eds. K. Dedié und H. Bostedt, Verlag Ulmer, Stuttgart
- EPPLESTON, J. (1986)
Establishment of a sheep embryo bank
18th Ann. Conf. of the Austr. Soc. for Reprod. Biol., Brisbane, Australia, p 139
- EVANS, G. and D.T. ARMSTRONG (1984)
Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments
J. Reprod. Fert. 70, 47-53
- GATICA, R., M.P. BOLAND, T.F. CROSBY and I. GORDON (1984)
Micromanipulation of sheep morulae to produce monozygotic twins
Theriogenology 21, 555-560
- HEISE, J. P. (1979)
Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Mäusezygoten unter Berücksichtigung der Äquilibrierungsdauer und hoher Einfriergeschwindigkeiten
Vet. med. Diss., Hannover
- HEYMAN, Y., Y. MENEZO, P. CHESNE, S. CAMOUS and V. GARNIER (1987)
In vitro cleavage of bovine and ovine early embryos: improved development using coculture with trophoblastic vesicles
Theriogenology 27, 59-68

- HULET, C.V. and M. SHELTON (1980)
Sheep and goats
In: Reproduction in farm animals, 346-357, ed. E.S.E. Hafez,
Verlag Lea und Febiger, Philadelphia
- HUNTER, G.L., C.E. ADAMS and L.E.A. Rowson (1955)
Inter-bred ovum transfer in sheep
J. Agr. Sci. 46, 142-149
- KILLEEN, I.D. (1976)
The effects of age of egg and site of transfer on survival of
transferred eggs in the ewe
Theriogenology 6, 637
- KILLEEN, I.D. and G.J. CAFFERY (1982)
Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope
Aust. Vet. J. 59, 95-96
- LEIBO, S.P. and P. MAZUR (1978)
Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing
In: Methods in mammalian reproduction, 179-201, ed. J.C. Dani-
el, Jr., Academic Press, New York
- LEIBO, S.P. (1984)
A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-
thawed bovine embryos
Theriogenology 21, 767-790
- MASSIP, A., P. VAN DER ZWALMEN, C. HANZEN and F. ECTORS (1982)
Fast freezing of cow embryos in french straws with an
automatic program
Theriogenology 18, 325-332
- MAZUR, P. (1966)
Theoretical and experimental effects of cooling and warming
velocity on the survival of frozen and thawed cells
Cryobiology 2, 181-192
- MAZUR, P. (1977)
The role of intracellular freezing in the death of cells
cooled at supraoptimal rates
Cryobiology 14, 251-272
- MC LAREN, A. (1978)
Der Embryo
In: Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere Band 2, 9-40, Eds.
C.R. Austin and R.V. Short, Verlag Paul Parey, Berlin
- MC KELVEY, W.A.C. and J.J. ROBINSON (1984)
Normal lambs born following transfer of embryos by laparoscopy
Vet. Rec. 114, 230
- MC KELVEY, W.A.C., J.J. ROBINSON and R.P. AITKEN (1985)
The evaluation of a laparoscopic insemination technique in
ewes
Theriogenology 24, 519-535

- MC KELVEY, W.A.C. and J.J. ROBINSON (1986)
Repeated recoveries of ovine ova by laparoscopy
Theriogenology 25, 171
- MC KELVEY, W.A.C., J.J. ROBINSON, R.P. AITKEN and I.S. ROBINSON (1986)
Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy
Theriogenology 25, 855-865
- MEINECKE-TILLMANN, S., B. MEINECKE, H. GIPS und P. EVERS (1983)
Steroidhormongehalt persistierender Follikel beim Schaf nach
Superovulation in Beziehung zur Befruchtung
Zuchthyg. 18, 98-99
- MEINECKE, B. und S. MEINECKE-TILLMANN (1986)
Befruchtungsergebnisse bei superovulierten Schafen und Ziegen
nach laparoskopisch kontrollierter transmural-intrauteriner
Insemination
Tierärztl. Prax. 14, 35-41
- MERRY, D.A., K.R. BONDIOLI, R.L. ALLEN and R.W. WRIGHT, Jr. (1984)
One-step sucrose dilution of frozen thawed sheep embryos
Theriogenology 22, 433-443
- MOORE, N.W. and J.N. SHELTON (1962)
The application of the technique of egg transfer to sheep
breeding
Aust. J. Agric. Res. 13, 718-724
- MUTIGA, E.R., A.A. BAKER and D. JILLELLA (1983)
Limitations of intrauterine balloon catheters for ova
collection in sheep
Theriogenology 20, 213-220
- NIEMANN, H., B. SACHER, E. SCHILLING und D. SMIDT (1982)
Qualität und Überlebensraten von Rinderembryonen nach schnel-
lem Tiefgefrieren und Auftauen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 415-519
- NIEMANN, H. (1983)
Theorie und Praxis des Tiefgefrierens von Rinderembryonen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 90, 109-114
- NIEMANN, H. (1985)
Freezing of bovine embryos: effects of a one-step addition
of 1,4 M glycerol
Theriogenology 23, 369-379
- PETERS, D.F., G.B. ANDERSON and P.T. CUPPS (1977)
Culture and transfer of sheep embryos
J. Anim. Sci. 45, 350-352

- POLGE, C. (1977)
The freezing of mammalian embryos: Perspectives and possibilities
In: The freezing of mammalian embryos Ciba Fdn. Symp. No. 52 (new series), p 3-13, eds. K. Elliot and J. Whelan, Elsevier, Amsterdam
- POLGE, C. and S.M. WILLADSEN (1978)
Freezing eggs and embryos of farm animals
Cryobiology 15, 370-373
- ROWSON, L.E.A. and C.E. ADAMS (1957)
An egg transfer experiment on sheep
Vet. Rec. 69, 849-850
- ROWSON, L.E.A. and R.M. MOOR (1966)
Development of the sheep conceptus during the first fourteen days
J. Anat. 100, 777-785
- ROWSON, L.E.A., R.M. MOOR and R.A.S. LAWSON (1969)
Fertility following transfer in the cow: effect of method, medium and synchronization of oestrus
J. Reprod. Fert. 18, 517-523
- SACHER, B., H. NIEMANN und E. SCHILLING (1986)
Versuche zur Superovulation bei Schafen gefährdeter Rassen
Zuchthyg. 21, 167-168
- SCHIEWE, M.C., A. BUSH, L.S. STUART and D.E. WILDT (1984)
Laparoscopic embryotransfer in domestic sheep: A preliminary study
Theriogenology 22, 675-684
- SCHIEWE, M.C., P.M. SCHMIDT, W.F. RALL and D.E. WILDT (1985)
Influence of cryoprotectant and plunge temperature on post-thaw viability of ovine embryos
Biol. Reprod. 32, Suppl. 1, 98
- SCHINDLER, H. and D. AMIR (1973)
The conception rate of ewes in relation to sperm dose and time of insemination
J. Reprod. Fert. 34, 191-196
- SCHNEIDER, U., J. HAHN und H. SULZER (1974)
Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mäuse- und Kanincheneizellen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 81, 470-448
- SCHNEIDER, U. and P. MAZUR (1983)
Changes in cell volume of mammalian zygotes under hyperosmotic conditions
Cryobiology 20, 741
- SCHNEIDER, U. and P. MAZUR (1984)
Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos
Theriogenology 20, 68-79

- SMITH, C.L. (1984)
Dose effect of follicle stimulating hormone for superovulation of crossbred Targhee ewes
Theriogenology 21, 262
- SMITH, C.L. and C.N. MURPHY (1984)
A modified antegrade uterine flush for recovery of ova in the ewe
In: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., 10-14 Jun, U II Urbana-Champaign, Vol. 2, paper no. 242, 3 p
- SMORAG, Z., S. WIERZBOWSKI, E. WIERZCHOS, A. LASZCZKA und B. GAJDA (1982)
Transplantation von tiefgefrorenen Schafembryonen
Arch. exper. Vet. med. 36, 163-167
- TERVIT, H.R., D.G. WHITTINGHAM and L.E.A. ROWSON (1972)
Successful culture in vitro of sheep and cattle ova
J. Reprod. Fert. 30, 493-497
- TERVIT, H.R. and L.E.A. ROWSON (1974)
Birth of lambs after culture of sheep ova in vitro for up to 6 days
J. Reprod. Fert. 38, 177-179
- TERVIT, H.R. and P.G. HAVIK (1976)
A modified technique for flushing ova from the sheep uterus
N.Z. Vet. J. 24, 138-140
- TERVIT, H.R. and P.G. GOOLD (1984)
Deep-freezing sheep embryos
Theriogenology 21, 268
- TORRES, S. et COGNIE (1984)
Superovulation and egg transfer in the ewe
Réprod. Nutr. Dévelop. 24, 623-631
- TORRES, S., Y. COGNIE and G. COLAS (1987)
Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P
Theriogenology 27, 407-419
- TOYODA, Y. and M.C. CHANG (1974)
Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer
J. Reprod. Fert. 36, 9-22
- TROUNSON, A.O. and N.W. MOORE (1974)
Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination
Aust. J. Biol. Sci. 27, 301-304
- WALKER, S.K., G.M. WARNES, P. QUINN, R.F. SEAMARK and D.H. SMITH (1985)
Laparoscopic technique for the transfer of embryos in sheep
Aust. Vet. J. 62, 105-106

- WALKER, S.K., R.J. ASHMAN, G.M. WARNES, D.H. SMITH and P. QUINN (1986)
Embryo transfer in the sheep
18th Ann. Conf. of the Austr. Soc. for Reprod. Biol.,
Brisbane, Australia, p 142
- WARE, C.B. and BOLAND, M.P. (1987)
Effect of varying glycerol and sucrose concentration combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed embryos
Theriogenology 27, 721-728
- WHITTINGHAM, D.G. (1971)
Survival of mouse embryos after freezing and thawing
Nature 233, 125-126
- WHITTINGHAM, D.G., M. WOOD, J. FARRANT, H. LEE and J.A. HALSEY (1979)
Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C
J. Reprod. Fert. 56, 11-21
- WILLADSEN, S.M., C. POLGE, L.E.A. ROWSON and R.M. MOOR (1974)
Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen
Cryobiology 11, 560
- WILLADSEN, S.M., C. POLGE, L.E.A. ROWSON and R.M. MOOR (1976)
Deep freezing of sheep embryos
J. Reprod. Fert. 46, 151-154
- WILLADSEN, S.M. (1977)
Factors affecting the survival of sheep embryos during deep freezing and thawing
In: The freezing of mammalian embryos Ciba Fdn. Symp. No. 52 (new series), p 175-189, eds. K. Elliot and J. Whelan, Elsevier, Amsterdam
- WILLADSEN, S.M., C. POLGE, A.O. TROUNSON and L.E.A. ROWSON (1977)
Transplantation of sheep and cattle embryos after storage at -196 °C
In: The freezing of mammalian embryos Ciba Fdn. Symp. No. 52 (new series), p 190-201, eds. K. Elliot and J. Whelan, Elsevier, Amsterdam
- WRIGHT, R.W., Jr., G.B. ANDERSON, P.T. CUPPS, M. DROST and G.E. BRADFORD (1976)
In vitro culture of embryos from adult and prepuberal ewes
J. Anim. Sci. 42, 912-917
- WRIGHT, R.W., Jr., K. BONDIOLI, J. GRAMMER, F. KUZAN and A. MERINO, Jr. (1981)
FSH or FSH plus LH superovulation in ewes following estrus synchronization with Medroxyprogesterone Acetate pessaries
J. Anim. Sci. 52, 115-118

ZANWAR, S.G. and B.R. DESHPANDE (1984)

Superovulation and embryo transfer in exotic and crossbred sheep

In: 10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., 10-14 Jun, U Il Urbana-Champaign, Vol. 2, paper no. 254, 3 p

Am Ende meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas sowie für die stets freundliche und verständnisvolle Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützten, sei ebenfalls herzlichst gedankt.

Herrn Dr. J. Braun möchte ich besonders für wertvolle Anregungen und praktische Hinweise danken.

Lebenslauf

Am 14. Mai 1959 wurde ich als Tochter des Sonderschulrektors Oskar Schad und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Bauer, Lehrerin, in Altötting geboren.

Von 1966 bis 1969 besuchte ich in München die Grundschule an der Haimhauserstraße und anschließend das Sophie-Scholl-Gymnasium. Dort legte ich im Juni 1978 die Reifeprüfung ab.

Zum Wintersemester 1978/79 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Tiermedizin, das ich im Juli 1984 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit November 1986 bin ich mit Abdelali Bouabid verheiratet.

Von Dezember 1984 bis Dezember 1987 war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität beschäftigt. Dort arbeitete ich von Dezember 1986 bis November 1987 auch als wissenschaftliche Hilfskraft.

